

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Sille Hausenberg

Ribonukleaaside RNAas R ja YbeY rollist ribosoomide lagundamisel *Escherichia coli*'s

Bakalaureusetöö

Juhendaja teadur Ülo Maiväli, PhD

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Ribosoomid <i>Escherichia coli</i> 's.....	6
1.1.1. Translatsioon <i>Escherichia coli</i> 's	6
1.1.2. Ribosoomide süntees	7
1.1.2.1. rRNA protsessimine	8
1.1.3. Ribosoomide lagundamine	9
1.1.3.1. Vead ribosoomide kokkupanekul	10
1.1.3.2. Inaktiivsed ribosoomid	10
1.1.3.3. Stress.....	10
1.2. RNAas R <i>Escherichia coli</i> 's.....	12
1.2.1. RNAas R-i ehitus	12
1.2.2. RNAas R on eksoribonukleas	13
1.2.3. RNAas R on helikaas.....	14
1.2.4. RNAas R-i funktsioonid	15
1.2.4.1. 16S rRNA valmimine	15
1.2.4.2. mRNA lagundamine	15
1.2.4.3. Ribosoomide kvaliteedikontroll	16
1.2.4.4. Ribosoomide lagundamine	17
1.2.4.5. <i>Trans</i> -translatsioon	17
1.2.5. RNAas R-i regulatsioon.....	18
1.2.5.1. RNAas R-i mRNA valmimine	18
1.2.5.2. Kasvufaasi ja keskkonna mõju	18
1.2.5.3. tmRNA ja SmpB roll RNAas R-i regulatsioonis.....	19
1.2.6. RNAas R-i homoloogid teistes organismides.....	20
1.3. YbeY <i>Escherichia coli</i> 's.....	23
1.3.1. YbeY ehitus	23
1.3.2. YbeY on endoribonukleas	24
1.3.3. YbeY on kuumašoki valk	24
1.3.4. YbeY võimalikud funktsioonid	25
1.3.4.1. rRNA transkriptsiooni antiterminatsioon	25
1.3.4.2. Translatsioon	26
1.3.4.3. rRNA protsessimine	26
1.3.4.4. Ribosoomide kvaliteedikontroll	28
1.3.4.5. Ribosoomide lagundamine	29

1.3.5. YbeY homologid teistes organismides	29
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	31
2.1. Töö eesmärgid	31
2.2. Materjal ja meetodika	32
2.2.1. Bakteritüved, oligonukleotiidid ja söötmed	32
2.2.2. Antibiootikumide minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni määramine	32
2.2.3. Kasvukõverate mõõtmine 37°C juures	33
2.2.4. Ribosoomide lagundamise uurimise katsesüsteem	33
2.2.5. Ribosoomide fraktsioonide ettevalmistamine Northern bloti jaoks	34
2.2.6. Northern blot	34
2.2.6.1. Geelelektroforees	35
2.2.6.2. RNA ülekanne membraanile	35
2.2.6.3. Hübridisatsioon	35
2.2.6.4. Membraani pesu	36
2.2.7. Signaali detekteerimine	36
2.2.8. Membraani puhastamine oligonukleotiididest	36
2.3. Tulemused	37
2.3.1. Kasvukõverad 37°C juures	37
2.3.2. Ribosoomide lagundamine	37
2.3.3. Antibiootikumide minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid	40
2.4. Arutelu	42
KOKKUVÕTE	44
SUMMARY	45
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	47
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	57
LISA 1	58
LISA 2	59
LIHTLITSENTS	60

KASUTATUD LÜHENDID

CAM - Kloramfenikool

Ery - Erütromütsiin

GAC – *GTPase-associated centre*, GTPd hüdrolyüsiv reaktsioonikeskus

MSA – *Multiple Sequence Alignment*, mitme järjestuse joondus

NRD – *Nonfunctional rRNA Decay*, rRNA lagunemisprotsess pagaripärmis

PAP I – Polü(A) polümeraas I

pnp – PNPaasi kodeeriv geen

PNPaas – Polünukleotiidfosforülaas

REP element – umbes 35-40 nt pikk korduv ekstrageenne palindroomne järjestus

RNAP – RNA polümeraas

rnb – RNAas II kodeeriv geen

rnv – RNAas R kodeeriv geen

r-valgud – Ribosoomi valgud

rrn operon – rRNA geene sisaldav operon

S – svedberg, sedimentatsioonikiiruse ühik

ybeY – YbeY kodeeriv geen

SISSEJUHATUS

Ribosoomid on olulised rakuorganelid, sest viivad läbi valkude sünteesi ehk translatsiooni. Valgud on aga organismide ehituskivid ning funktsioonide täitjad. Ilma valke juurde sünteesimata pole organismidel võimalik kasvada ega paljuneda. Ribosoomid ise koosnevad nii valkudest kui ka RNast ning ribosoomide tootmisele kulutatakse rakkudes palju energiat ja ressursse. Enne raku jagunemist peab ribosoomide arvukus kasvama, et tagada normaalne elutegevus.

Seega võiks loogikapõhiselt arvata, et ribosoomid, mille tootmise alla on kord juba nii palju ressursse pandud, on stabiilsed. Ometi on avastatud, et teatud tingimustel lagundatakse rakkudes ka neid (ülevaated Deutscher, 2009; Maiväli *et al.*, 2013). Ribosoomide lagundamise põhjuseid on küllaltki põhjalikult uuritud mudelorganismis *Escherichia coli*, kuid täpset mehhanismi pole õnnestunud veel välja selgitada. On avastatud mitmeid eksoribonukleaase, mis lagundavad rRNA (ribosomaalse RNA) fragmente, kuid endoribonukleaas(id), mis võiks(id) teha rRNAse esimesed lõiked, pole teada (Basturea *et al.*, 2011; Deutscher, 2009).

Üks eksoribonukleasidest, mille osalust ribosoomide lagundamisel on märgatud, on RNAas R (Basturea *et al.*, 2011). RNAas R-i puhul on erakordne selle võime lagundada sekundaarstruktuuridega RNAd (nagu seda on rRNA) ilma helikaaside abita (Cheng ja Deutscher, 2002). YbeY on endoribonukleaas, mis koostöös RNAas R-ga osaleb ribosoomide kvaliteedikontrolli mehhanismis (Jacob *et al.*, 2013). Peale selle leidub ka andmeid, mis viitavad võimalusele, et YbeY võib olla endonukleaas, mis initsieerib ribosoomide lagundamise (Anton Paier, avaldamata andmed, TÜTI, Eesti).

Käesolevas töös esitatakse põhjalik ülevaade ribonukleasidest RNAas R ja YbeY ning nende funktsioonidega seotud elutegevuse protsessidest *Escherichia coli*'s, et lihtsustada nende ensüümide rollide olulisuse ja keerukate interaktsioonide mõistmist rakus. Eksperimentaalses osas uuritakse, kuidas mõjub RNAas R-i ja YbeY puudumine ribosoomide lagundamisele *Escherichia coli*'s ning kas valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide kloramfenikooli ja erütromütsiini lisamine mõjutab seda protsessi. Peale selle uuritakse, kas ribosoomide lagundamine võib olla osa nende antibiootikumide toimet mehhanismist rakkude kasvu inhibeerimisel.

Märksõnad: Antibiootikumid, ribosoomide lagundamine, rRNA protsessimine, RNAas R, YbeY

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ribosoomid *Escherichia coli*'s

Ribosoomid on rakuorganellid, mis viivad läbi translatsiooni ehk valkude sünteesi aminohapetest (Watson *et al.*, 2004). Ribosoom koosneb suurest ja väikesest alamühikust, mille moodustavad ribosomaalne RNA (rRNA) ja ribosomaalsed valgud (r-valgud). *Escherichia coli*'s (*E. coli*) koosnevad 70S ribosoomid suurest ehk 50S alamühikust ja väikesest ehk 30S alamühikust. Ribosoomiosakesed on nimetatud nende sedimentatsioonikiiruse järgi tsentrifuugimisel. Sedimentatsioonikiirus arvestab nii osakese massi kui ka kuju ning selle ühikuks on svedberg (S). 50S alamühik koosneb 5S ja 23S rRNA molekulidest ja 34 r-valgust. 30S alamühik koosneb 16S rRNA molekulist ja 21 r-valgust. Kuigi ribosoomide koostises on rohkem valke kui RNA molekule, moodustab ribosoomi massist (umbes 2,5 MDa) peaaegu kaks kolmandikku rRNA (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). r-valgud on väikese molekulmassiga, näiteks väikese alamühiku valkude keskmine molekulmass on umbes 15 kDa. Kuna aga 16S ja 23S rRNA-d on väga pikad molekulid, on neil ka suur molekulmass (tabel 1).

Tabel 1. rRNA molekulide ligikaudne pikkus ja molekulmass.

Tunnus/Molekul	16S rRNA	23S rRNA	5S rRNA
Pikkus (nt)	1540	2900	120
Molekulmass (kDa)	508	957	40

1.1.1. Translatsioon *Escherichia coli*'s

Translatsioon toimub tänu kolme tRNA seondumissaidi, kolme reaktsioonikeskuse, ühe tunneli ja ühe kanali olemasolule ribosoomides. A, P ja E saidid asuvad kahe alamühiku kokkupuutepinnal. A saidiga seondub aminoatsüül-tRNA, P saidiga peptidüül-tRNA ja peptiidahelast vabastatud tRNA lahkuib ribosoomist E saidi kaudu. Dekodeeriv keskus asub ribosoomi 30S alamühikus. Seal toimuvad interaktsioonid mRNA koodonite ja tRNA-de antikoodonite vahel, mistõttu on võimalik RNA järjestuse kodeerimine valgu aminohappeliseks järjestuseks. 50S alamühikus asub peptidüültransferaasi keskus, kus katalüüsitakse peptiidside teke peptiidahela ning tRNA-ga seotud aminohappe vahel. Ribosoomi on kutsutud ka ribosüümideks (Cech, 2000), sest peptidüültransferaasi keskus koosneb täielikult rRNA-st, mitte r-valkudest. Enamik r-valke asetsevad ribosoomide välispinnal, mitte sisemuses. Ent 50S alamühikus asub ka GAC (*GTPase-associated centre*) reaktsioonikeskus, mille moodustavad nii 23S rRNA kui ka r-valgud L11 ja L12. Selles

keskuses katalüüsitakse GTP hüdrolüüsi, mis on vajalik paljude translatsioonifaktorite tööks (Voorhees *et al.*, 2010). mRNA sisenemiseks ja väljumiseks on ribosoomi väikeses alamühikus kitsas kanal, mille keskel on ala, kus mRNA on tRNAdele ligipääsetav. Translatsiooni käigus tekkiva peptiidahela väljumiseks ribosoomist on olemas tunnel, mis asub 50S alamühikus. Mõlemat iseloomustab kitsas kuju, mis piirab neid läbivate ahelate sekundaarstruktuuride teket (Watson *et al.*, 2004).

Ribosoomide 30S ja 50S alamühikud moodustavad ühtse 70S ribosoomi vaid translatsiooni toimumise ajal. Jõudeolekus on ribosoomi alamühikud dissotsieerunud ning need liituvad alles pärast seda, kui väikese alamühikuga on seondunud mRNA ja initsiaator-tRNA. Viimane lisab bakterites valgu esimeseks aminohappeks alati formülmethionini. Translatsioon kulgeb mRNA ahela 5' otsa poolt 3' otsa suunas ning peptiidahela N-terminuse poolt C terminuse suunas, sest aminohappeid lisatakse peptiidahela C-terminusele. Prokarüootides toimub translatsioon kiirusega 2...20 aminohapet sekundis, mis vastab umbes transkriptsiooni kiirusele 50...100 nukleotiidi sekundis. Translatsioon lõpeb, kui ribosoomi A-saiti satub stopp-koodon. Lõpetatud peptiidahel vabastatakse ribosoomist ning ribosoomi alamühikud eemalduvad teineteisest. Seejärel on dissotsieerunud alamühikud võimelised alustama uut translatsioonitsüklit, seondudes uue mRNAga (Watson *et al.*, 2004).

Prokarüootide translatsiooni eripära eukarüootidega võrreldes seisneb selles, et ribosoomid asuvad rakus RNA polümeraasiga (RNAP) samas ruumis ehk translatsioon teatud mRNAlt saab toimuda samaaegselt selle mRNA transkriptsiooniga. Need protsessid võivad toimuda kõrvuti, sest prokarüootides puudub tuum. Samalt mRNAlt võib korraga transleerida mitu ribosoomi. Ühe mRNAga seotud mitut ribosoomi kutsutakse polüribosoomiks või polüsoomiks. Üks ribosoom võtab enda alla umbes 80-nukleotiidilise ala mRNA-l, kuigi on otseses kontaktis vaid umbes 30 nukleotiidiga (Watson *et al.*, 2004).

1.1.2. Ribosoomide süntees

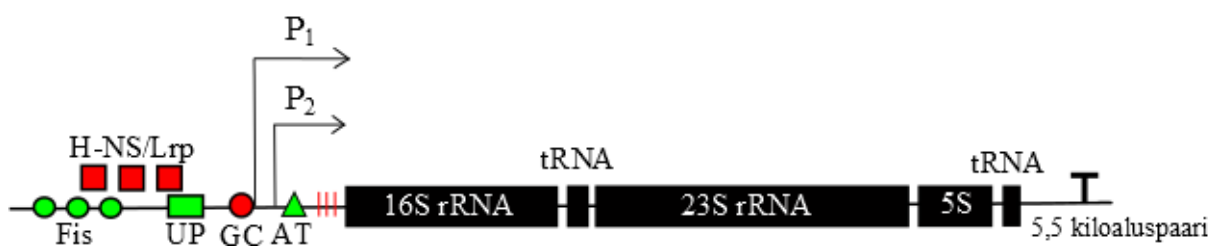
Ribosoomide 16S, 23S ja 5S rRNA molekulid transkribeeritakse *Escherichia coli*'s seitsmelt peaaegu identselt *rrn* operonilt ühe transkriptina. rRNA töötlemine algab enne seda, kui terve transkript valmis on. Samaaegselt hakkavad tekkima lokaalsed sekundaarstruktuurid, r-valgud seostuvad rRNAga oma seondumiskohtades, rRNA-d modifitseeritakse keemiliselt ning seda lõikavad RNAasid, et tekiks 16S, 23S ja 5S rRNA molekulid (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

Escherichia coli's on 19 r-valkude operoni, kus esineb peale r-valkude geenide ka teisi translatsiooniga seotud valkude gene, näiteks elongatsioonifaktorite EF-G, EF-Tu ja EF-Ts

geenid (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Samuti on nendes operonides RNAP alamühikute α , β ja β' geenid. Kui rRNA hulka rakus reguleeritakse põhiliselt transkriptsiooni tasemel, siis r-valkude hulk rakus sõltub rRNA kogusest ning regulatsioon toimub translatsiooni tasemel autogeense tagasiside teel. Autogeense tagasiside mehhanism toimib teatud r-valkude võime tõttu seonduda peale rRNA ka ennast kodeeriva mRNAga. Seostumine nii rRNA kui ka mRNAga on võimalik tänu rRNA seondumiskohtadega sarnaste järjestuste ja sekundaarstruktuuride olemasolule mRNAs. Kui rRNA molekule, millega r-valgud seonduda saavad, on vähem kui valmis r-valke, siis takistavad teatud r-valgud edasist translatsiooni r-valkude operonidelt. Nad seostuvad operoni mõne esimese geeni järjestusega nii, et ribosoomid ei saa mRNAga seonduda ja translatsiooni alustada. Need repressorvalgud teevad seda vaid siis, kui rakus on r-valke, mis ei saa seonduda rRNAga, sest kõik olemasolevad rRNA molekulid on juba seostunud ühe koopiaga igast r-valgust (Watson *et al.*, 2004). Ent autogeenne tagasiside regulatsioon ei toimu kõikide r-valkude operonide puhul. Nende r-valkude, mis ei seonu otseselt rRNAga, operonide ekspressiooni reguleeritakse tõenäoliselt transkriptsiooni tasemel ning valkude lagundamisega (Wikström *et al.*, 1988).

1.1.2.1. rRNA protsessimine

E. coli genoomis on seitse peaaegu identset *rrn* operoni (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* ja *rrnH*), millelt rRNA-d transkribeeritakse. Igas operonis on olemas 16S, 23S ja 5S rRNA geenid (vt joonis 1). Peale selle leidub eri operonides ka erinevate tRNA-de geene. Igalt *rrn* operonilt sünteesitakse üks transkript, mille pikkus on keskmiselt 5500 nukleotiidi (Jin *et al.*, 2012).

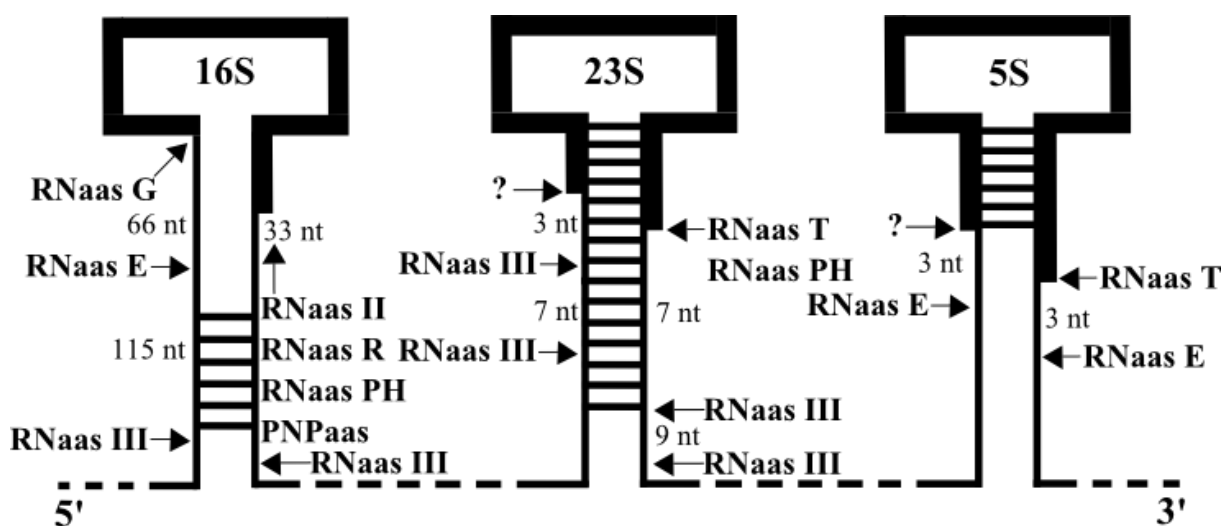


Joonis 1. *E. coli* *rrn* operonide üldine ehitus. Mustad kastid kujutavad rRNA ja tRNA geene. rRNA transkriptil on kaks promootorit (P1 ja P2) ning terminaatorid (T). Rohelised ja punased sümbolid kujutavad *rrn* operoni regulaatorelemente: punaste ruutudega on märgitud regulaatorvalkude H-NS ja Lrp seondumisala ning rohelistest ringidega regulaatorvalgu Fis seondumisala, roheline ristkülik tähistab UP elementi, punane ring guaniini ja tsütosiini rikast diskriminaator-regiooni, roheline kolmnurk antiterminatsioonisüsteemi ning punased püstkriipsud transkriptsiooniliste pauside ala (Jin *et al.*, 2012).

On avastatud, et RNAas III lõikab selle transkripti endoribonukleolüütiliselt osadeks (Young ja Steitz, 1978; Bram *et al.*, 1980) kohe, kui saab tekkida vajalik sekundaarstruktuur 16S rRNA geeniga külgnevate alade vahel, mis on komplementaarsed (vt joonis 2). See lõikamine

toimub enne terve operoni transkriпти teket (Gegenheimer ja Apirion, 1975) ning pärast seda kordub sama protsess 23S rRNA geeni puhul. Tulemuseks on 17S, p23S ja 9S molekulid, mis on vastavalt 16S, 23S ja 5S rRNAde eellased, mille mõlemas otsas on peale küpse molekuli järjestuse ka lisanukleotiide (Young ja Steitz, 1978; Bram *et al.*, 1980).

16S rRNA molekuli valmimisel on mitu etappi. RNAas III lõige jätab 17S eellasmolekulile 5' otsa 115 lisanukleotiidi ning 3' otsa 33 lisanukleotiidi (Young ja Steitz, 1978). 3' otsast eemaldavad üleliigsed 33 nukleotiidi neli eksoribonukleasi: RNAas II, RNAas R, RNAas PH ja PNPaas (polünukleotiidfosforülaas) (Sulthana ja Deutscher, 2013). Endoribonukleas RNAas E teeb lõike 5' otsa järjestusse, jättes alles veel 66 nukleotiidi. Need eemaldab endoribonukleolüütilise lõikega RNAas G (Li *et al.*, 1999a; Wachi *et al.*, 1999). RNAas III lõikab algset *rrn* operoni transkriпти 23S rRNA geeni ümber, jättes 5' otsa alles kas 7 või 3 lisanukleotiidi ning 3' otsa 7 kuni 9 lisanukleotiidi (King *et al.*, 1986). 23S rRNA 3' otsast eemaldab üleliigsed nukleotiidid eksoribonukleas RNAas T (Li *et al.*, 1999b), kuigi kõige vältimised näib eemaldavat hoopis RNAas PH (Gutgsell ja Jain, 2012). 5' otsa valmimise läbiviijat pole tuvastatud. 5S rRNA 9S eellasmolekuli lõikab endoribonukleas RNAas E, kuid jätab küpsele molekulile nii 3' kui ka 5' otsa kolm lisanukleotiidi (Misra ja Apirion, 1979). RNAas T eemaldab need selle 3' otsast nagu 23S eellase puhulgi (Li ja Deutscher, 1995). Samamoodi pole teada, milline ensüüm osaleb 5S rRNA molekuli 5' otsa valmimisel.



Joonis 2. *E. coli* rRNA transkriпти protsessimissaidid (Deutscher, 2009, täiendatud uuemate andmetega).

1.1.3. Ribosoomide lagundamine

rRNAd ja tRNAd kutsutakse stabiilseks RNAs, sest võrreldes mRNAga on nende pooleluiga pikem. Ribosoomide tootmine on rakule energiakulukas protsess - sellele kulub nii

transkriptsiooni kui ka translatsiooni tasemel palju ressursse. Ometi näib, et rakkudes lagundatakse teatud tingimustel ka rRNAd. Seda võivad põhjustada mitmed asjaolud.

1.1.3.1. Vead ribosoomide kokkupanekul

Ribosoomide ehituse keerukust arvestades võib eeldada, et rRNA protsessimine, modifitseerimine ning r-valkudega seondumine ei möödu alati veatult ning tekkida võib ribosoomi või ribosoomide eellasi, mis ei suuda korralikult funktsioneerida (Maiväli *et al.*, 2013). Gausing (1977) on näidanud, et rRNA transkribeerimise kiirus on alati suurem kui valmis rRNA kuhjumise kiirus. Seda efekti võib eriti näha aeglase kasvukiiruse juures, kus vaid umbes 30% sünteesitud rRNast ühendatakse ribosoomide koostisesse. Seega on järeldatud, et ülejäänud rRNA rakkudes lagundatakse. Valesti kokku pandud ribosoomide lagundamine algab endonukleolüütilisest lõikest seni tundmata ensüümi poolt (Basturea *et al.*, 2011), seejärel lagundamise vaheproduktid polüadenüleeritakse (Maes *et al.*, 2011) ning need on substraadiks PNPaasile ja RNAas R-le (Basturea *et al.*, 2011). Arvatavasti lagundab puudulikke rRNAsid *E. coli*'s ka degradosoom, mis koosneb endoribonukleaasist RNAas E-st, PNPaasist, RNA helikaasist RhlB ning glükolüütilisest ensüümist enolaasist. Sellele viitab degradosoomi ja ribosoomide (ning polüsoomide) stabiilsete komplekside olemasolu (Tsai *et al.*, 2012). Samuti on degradosoomist leitud rRNA fragmente, tRNA fragmente aga mitte (Bessarab *et al.*, 1998).

1.1.3.2. Inaktiivsed ribosoomid

Näib, et ribosoomide kokkupanek võib toimuda korrektselt ka siis, kui rRNAs on mutatsioonid, mis muudavad ribosoomid translatsiooni-võimetuks. Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* lagundatakse spetsiifiliselt sellised inaktiivsed ribosoomide alamühikud. Sellele protsessile on antud nimi NRD – *Nonfunctional rRNA Decay* (LaRiviere *et al.*, 2006). Ent *E. colis* põhjustavad vaid osad samasugused mutatsioonid ribosoomide lagundamist. Peamise erinevusena lagundatakse *E. colis* aga mõlemat alamühikut, nii mutantset kui ka metsiktüüpi subühikut (Anton Paier, käsikiri, TÜTI, Eesti). Jacob ja kaasautorid (2013) on avastanud kvaliteedikontrollimehhanismi, mis toimib *E. colis* 70S ribosoomide tasemel. Seda protsessi kirjeldatakse käesolevas töös peatükis 1.3.4.4.

1.1.3.3. Stress

Huvitaval kombel lagundatakse rakkudes teatud stressitingimuste korral ka täiesti korrektselt kokku pandud ja töötavaid ribosoomi (ülevaade Maiväli *et al.*, 2013). Kui rakud on füüsiliselt kahjustatud nii, et periplasmast pääseb tsütoplasmasse RNAas I, lagundab see ribosoomid väga efektiivselt (Deutscher, 2009). Näljatingimustes toimub rRNA lagundamine mitme

etapina. Esmalt lõigatakse rRNA endonukleolüütiliselt veel tundmata endoribonukleaasi poolt fragmentideks ning seejärel eemaldavad eksoribonukleasid RNAas PH, RNAas II ja RNAas R need lõplikult (Deutscher, 2009; Basturea *et al.*, 2011). Mõned tähelepanekud viitavad sellele, et endonukleolüütilisi lõikeid võib teha näiteks RNAas LS (Otsuka ja Yonesaki, 2005).

Ribosoomide lagundamine ei pruugi alati päädida rakkude surmaga. Basturea ja kaasautorid (2012) on oletanud, et arseeni olemasolust tingitud ribosoomide lagundamine *E. coli*'s, mis kasvas fosforivabas söötmes, tagas vajaliku fosfori hulga väikese rakkude populatsiooni ellujäämiseks. Seega näib, et kui heades kasvutingimustes võib ribosoomide vähesus rakkude kasvu piirata (Scott *et al.*, 2010), siis kehvades kasvutingimustes võib üleliigsete funktsioneerivate ribosoomide lagundamine osutuda heaks ellujäämise strateegiaks. Tundub, et töökõlblike ribosoomide lagundamine ei toimu vaid äärmuslikes tingimustes, vaid ka kasvu aeglustumisel. Seda on näidanud eksperimendid mittepidevate kultuuridega, kus on täheldatud rohkem kui poolte ribosoomide lagundamist üleminekul eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse (Piir *et al.*, 2011). Samas on ribosoomid stabiilsed, kui rakud on statsionaarses faasis või kasvavad eksponentsiaalses faasis konstantse kasvukiirusega (Piir *et al.*, 2011).

Stressi saab ka kunstlikult esile kutsuda antibiootikumide abil. Mõned antibiootikumid segavad ribosoomide kokkupanekut, näiteks erütromütsiin ja kloramfenikool segavad 50S alamühikute kokkupanekut ning neomütsiin 30S alamühikute kokkupanekut (Chittum ja Champney, 1995; Sykes *et al.*, 1977; Foster ja Champney, 2008). Selle tulemusel suureneb ribosoomide degradatsioon (Silvers ja Champney, 2005). Uuritud on ribosoomide lagundamisel osalevate RNAaside nullmutante. PNPaasi ja RNAas II nullmutandid on asitromütsiini (erütromütsiini analoog) suhtes hüpertundlikud (Silvers ja Champney, 2005). Kahjuks ei ole sellistes tingimustes uuritud Δrnr tüve, kust puudub RNAas R. *E. coli* metsiktüüpi tüve kasvatamisel kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolekul on avastatud, et tekivad ribosoomide lisapartiklid, mis sisaldavad nii 23S kui ka 16S rRNA molekulide osasid (Siibak *et al.*, 2009). Need andmed viitavad faktile, et kuigi erütromütsiin ja kloramfenikool seonduvad ribosoomi 50S alamühikuga (vastavalt peptiidi väljumistunnelis ja peptidüültransferaasi keskuses), põhjustavad nad kaudselt defekte ka 30S alamühiku kokkupanekul. Ka Usary ja Champney (2001) on uurinud erütromütsiini mõju *E. coli*le. Nad on avastanud, et RNAas E, mida arvatakse osalevat rRNA lagundamisel degradatsioonis (Bessarab *et al.*, 1998), puudumisel kuhjub erütromütsiiniga töödeldud rakkudes rohkem rRNA fragmente, kui selle olemasolul.

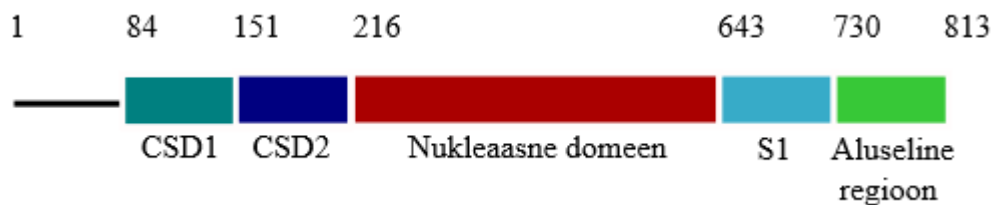
1.2. RNAas R *Escherichia coli*'s

Ribonukleas R ehk RNAas R on eksoribonukleas, mis lõikab RNA ahelat 3' otsast 5' otsa suunas. RNAas R valku kodeerib *rnr* geen (sünonüümid *vacB*, *yjeC*). *E. coli* RNAas R-i pikkus on 813 aminohapet ning selle arvutuslik molekulmass on 92 109 Da (Cheng *et al.*, 1998). Selle aminohappeline järjestus on leitav Swiss-Prot andmebaasist ligipääsunumbri P21499 abil. RNAas R on RNAas II homoloog ning mõlemad kuuluvad RNR valguperekonda, mille liikmeid leidub nii bakterite kui eukarüootide seas (Zuo ja Deutscher, 2001). RNAas R erineb RNAas II-st, sest suudab lagundada sekundaarstruktuure sisaldavat RNAd, kaasa arvatud rRNAd (Cheng ja Deutscher, 2002). RNAas R nullmutandi kasv ei ole aeglasem kui metsiktüüpi tüvel, ent tüvi, kust on puudu nii RNAas R kui ka polünukleotiidfosforülaas (PNPaas), ei suuda kasvada. See viitab nende kahe ensüümi kattuvale funktsioonile (Cheng *et al.*, 1998). RNAas R interakteerub ribosomaalse valgu S12 D88 konserveerunud linguga (Strader *et al.*, 2013). Ribosoomide fraktsioneerimisel sahharoosigradiendis on leitud, et RNAas R liigub põhiliselt koos 30S alamühikuga, kuigi teda leidub veidi ka 50S alamühikute ja 70S ribosoomide fraktsioonides (Malecki *et al.*, 2014).

1.2.1. RNAas R-i ehitus

On ennustatud, et RNAas R on monomeerne valk (Cheng ja Deutscher, 2002). RNAas R kristallstruktuur ei ole määratud, ent homoloogia alusel RNAas II-ga on loodud RNAas R struktuuri mudel (Barbas *et al.*, 2008).

RNAas R sisaldab S1 domeeni, mis aitab sellel seonduda RNAle (Bycroft *et al.*, 1997). Lisaks sellele on RNAas R-il ka keskel nukleasne domeen (RNB domeen), kaks külmašoki domeeni (CSD1 ja CSD2) valgu N-terminaalses otsas ning väga aluseline regioon valgu C-terminaalses otsas, mis sisaldab palju lüsiinijääke (Vincent ja Deutscher, 2009a) (vt joonis 3). Kuna S1 domeen sarnaneb oma ehituselt väga CSD domeenidele, võib öelda, et RNAas R-il on kolm külmašoki domeeni (Awano *et al.*, 2010). CSD domeenid ja S1 domeen aitavad kaasa substraat-RNA sidumisele ja efektiivsele katalüüsile selle lagundamisel (Vincent ja Deutscher, 2009a; Matos *et al.*, 2009). Katsetulemused viitavad sellele, et CSD domeenid võivad osaleda pigem substraadi algsel sidumisel ning S1 domeen selle õigesti orienteerimisel ja stabiliseerimisel katalüütilises vaos (Matos *et al.*, 2009). Lüsiinirikas domeen RNAas R-i C-terminaalses otsas võib olla seotud võimega lagundada kaksikahelalist RNAd (Matos *et al.*, 2011).



Joonis 3. RNAas R domeenne ehitus (Vincent ja Deutscher, 2009a järgi). CSD domeenid on külmašoki domeenid ja S1 domeen on algselt tuvastatud r-valgus S1 ning see on sarnane külmašoki domeenidele. Numbrid tähistavad aminohappeid.

RNAas R-i ribonukleasse aktiivsuse seisukohast on olulised kolm aspartaadijääki. Katseliselt on leidnud kinnitust, et D272 ja D280 mutandid ei suuda RNA substraate lagundada. D278 muteerimine viib vähesema substraadi lagundamiseni (Awano *et al.*, 2010). Ka Matos ja kaasautorid (2009) on näinud, et D280N mutant suudab küll RNA substraadile seonduda, kuid mitte seda lagundada. Seevastu RNAas R-i Arg572 muteerimine lüsiiniks (nagu RNAas II-s) viib pikemate lõpp-produktide tekkeni ning mutantse RNAas R-i peatusteni RNA sekundaarstruktuure lagundades. Seega võib R572 olla oluline aminohappejääk RNA substraadi sidumisel (Vincent ja Deutscher, 2009b). Pikemate lõpp-produktide teket on nähtud ka Tyr324 muteerimiselalaniiniks (Matos *et al.*, 2009).

1.2.2. RNAas R on eksoribonukleas

Cheng ja Deutscher (2002) on välja arendanud kiire RNAas R-i puhastamise meetodi. Puhastatud RNAas R-i omadusi uurides leidsid nad kinnitust faktile, et RNAas R on protsessiivne eksoribonukleas, mis lõikab RNAd 3' otsast 5' otsa suunas, vabastades 5'-nukleosiidmonofosfaate. RNAas R-i töö tulemusena võib RNA molekulist alles jääda di- või trinukleotiidid, mis lagundatakse rakus arvatavasti oligoribonukleasi poolt. RNAas R ei suuda lagundada DNA ahelaid ega kaksikahelalisi RNA:RNA või RNA:DNA ahelaid (isegi siis mitte, kui on olemas 4 nukleotiidi pikkune eenduv üksikahel)(Cheng ja Deutscher, 2002). Selleks, et RNAas R kaheahelalist RNA ahelat lagundada suudaks, peab selle 3' otsas olema vähemalt 7 nukleotiidi pikkune üksikahelaline RNA ahel, et RNAas R sellega seonduda suudaks. Need andmed viitavad sellele, et RNAas R-ga tugevalt seondumiseks peab RNA üksikahelaline osa ulatuma piisavalt kaugele ensüümi sisse (Vincent ja Deutscher, 2006). Samas on Matos ja kaasautorid (2009) avastanud, et RNAas R-i nukleasne domeen üksi suudab lagundada kaheahelalist RNAd ka ilma eenduva üksikahela olemasoluta. See võib tähendada, et CSD ja S1 domeenid aitavad metsiktüüpi RNAas R-il välja valida lagundamiseks sobivaid RNA ahelaid. Näib, et RNAas R vajab just S1 domeeni olemasolu tõttu kaheahelalise RNA 3' otsa üheaahelalist eenduvat järjestust, et seda lagundada (Matos *et al.*, 2011).

Matos ja kaasautorid (2011) on RNAas II ja RNAas R-i eri domeenide vahetamisel avastanud, et RNAas R-i S1 ja nukleaasne domeen määravad RNA lagundamise lõpp-produktide pikkuse (kaks nukleotiidi), kuigi tõenäoliselt mõjutavad seda ka RNAd siduvad domeenid. RNAas R-i S1 domeeni olemasolul RNAas II-s oli mutantne ensüüm võimeline lagundama kaksikahelalist RNAd, kui sellel oli olemas 3' otsas üksikahelaline RNA. Kui sellest mutantsest valgust aga deleteeriti veel C-terminaalsest lüsiinirikast regioonist kolm viimast ennustatud heeliksit, ei olnud mutantne RNAas II enam üldse võimeline kaksikahelalist RNAd lagundama. Seega võib arvata, et C-terminaalse regiooni lüsiinirikastel heeliksitel võib ka RNAas R-is sarnane roll olla, kuigi seda on nukleaasse domeeni aktiivse osaluse tõttu keeruline detekteerida.

RNAas R suudab hästi lõigata sünteetilist Polü(A) RNA ahelat ning 16S ja 23S rRNAd, ent lõikab kehvemini 5S rRNAd ja tRNAd. On avastatud, et RNAas R ei vaja RNA molekuli lõikamiseks selle 3' otsa hüdroksüülrühma: see suudab lagundada ka molekule, mille 3' otsas on fosfaatrühm (Cheng ja Deutscher, 2002).

1.2.3. RNAas R on helikaas

Asjaolu, et RNAas R suudab lagundada rRNAd, samas kui tema homoloog RNAas II seda ei suuda, viitab sellele, et RNAas R suudab efektiivsemalt lagundada sekundaarstruktuuride rohket RNAd kui RNAas II (Cheng ja Deutscher, 2002). Selle põhjuse on avastanud Awano ja kaasautorid (2010), kes kirjeldasid RNAas R helikaasset aktiivsust. Nad hakkasid selle olemasolu võimalikkust uurima pärast seda, kui selgus, et RNAas R suudab külmašoki ajal (15°C) komplementeerida külmašoki valgu helikaas CsdA funktsioone. RNAas R on teadaolevalt ainus ribonukleaas, mis seda teha suudab. RNAas R-i helikaasne aktiivsus ei sõltu ribonukleaasse aktiivsuse olemasolust (Awano *et al.*, 2010). Helikaasse aktiivsuse asukoha kohta on vasturääkivaid andmeid. Awano ja kaasautorid (2010) on rõhutanud CSD2 ja teiste külmašoki domeenide vajalikkust helikaasse aktiivsuse olemasolu jaoks. Samas on Vincent ja Deutscher (2009a) näinud, et sekundaarstruktuuridega RNA lagundamiseks piisab ka vaid nukleaasse domeeni olemasolust. Ka Matos ja kaasautorid (2011) on jõudnud järeldusele, et kaksikahelalise RNA lagundamine sõltub nukleaasse domeeni olemasolust, kuid nad väidavad ka, et RNAas II kontekstis on vaja lüsiinirikast järjestust RNAas R-i C-terminaalsest otsast (koos S1 domeeniga), et muuta võimalikuks üksikahelalise 3' otsaga kaksikahelalise RNA lagundamine RNAas II poolt. Selle avastuse põhjal on nad välja pakkunud hüpoteesi, et RNAas R-i C-terminaalse otsa lüsiinirikas regioon osaleb kaheahelalise RNA ahela lahti keeramisel, nii et helikaasne aktiivsus paikneb hoopis seal.

1.2.4. RNAas R-i funktsioonid

E. coli's on RNAas R-I oluline osa RNA metabolismis. Oma eksoribonukleasse aktiivsuse tõttu osaleb see erinevat tüüpi RNA molekulide lagundamisel. Samuti on RNAas R-il tähtis roll *trans*-translatsiooni protsessis, mis võimaldab defektsetele mRNAdele kinni jäänud ribosoomidel neist vabaneda. Peale selle osaleb RNAas R ka 16S rRNA küpsemisel.

1.2.4.1. 16S rRNA valmimine

Sulthana ja Deutscher (2013) on määranud 16S rRNA 3' otsa valmimise mehhanismi ning avastanud, et RNAas R on üks neljast eksoribonukleasist, mis on võimelised 16S rRNA eellase 3' otsa lõikama. Kuigi varem arvati, et selles protsessis võiks osaleda hoopis endoribonukleas, sest lõikamise vaheprodukte ei suudetud tuvastada, on nüüd nähtud, et nii RNAas II, RNAas R, RNAas PH kui ka PNPaas suudavad seda protsessiivselt läbi viia. 16S rRNA 3' otsa küpsemiseks piisab vaid neist ühe olemasolust. Neist kõige efektiivsemalt lõikavad 16S rRNA eellast RNAas II ja RNAas R. PNPaas on veidi vähem efektiivne kui eelmised, kuid ainult RNAas PH olemasolu rakus lõpeb vaid umbes 50% 16S rRNA normaalse protsessimisega. Ometi ei ole teada, kuidas suudavad protsessiivsed RNAasid just õiges kohas RNA lagundamise lõpetada, nii et tekib täiesti korrektne 16S rRNA molekul.

1.2.4.2. mRNA lagundamine

mRNA lagundamine on oluline võtte valkude hulga reguleerimiseks rakus. Arvatakse, et see algab endonukleolüütilise lõikega RNA ahela sees, millele järgneb lagundamine eksoribonukleaside RNAas II ja PNPaasi poolt. Cheng ja Deutscher (2005) on avastanud, et selles protsessis osaleb sekundaarstruktuure sisaldavate mRNAde puhul ka RNAas R. Nad on näidanud RNAas R-i osalust korduvaid ekstrageenseid palindroomseid järjestusi (REP elemente) sisaldavate mRNAde lagundamisel. REP elemendid on u 35-40 nukleotiidi pikad järjestused, mida leidub *E. coli* genoomis sadades koopiates, enamasti transkribeeritavates regioonides. Kui mitu REP elementi asub lähestikku, nagu näiteks araBAD operonis, siis moodustavad need transkribeerimisel juuksenõelstruktuure, mida RNAas II ei suuda lagundada, kuid PNPaas (heliikaasi abiga) ja RNAas R suudavad.

RNAas R osaleb ka OmpA mRNA lagundamisel statsionaarses faasis (Andrade *et al.*, 2006). OmpA on *E. coli* välismembraani valk A. RNAas R nullmutandis oli OmpA hulk statsionaarses faasis neli korda suurem kui metsiktüüpi tüves ning OmpA mRNA oli kaks korda stabiilsem. Sellist efekti ei nähtud mõnede teiste mRNAde juures, nii et võib arvata, et RNAas R reguleerib mRNA hulka vaid teatud kindlate transkriptide puhul. Kuigi on avastatud, et OmpA transkripti hulga regulatsioonis statsionaarses faasis osalevad ka RNAas E, PAP I

(Polü(A) polümeraas I) ja PNPaas, tundub, et neil on selles protsessis erinevad rollid, sest vastavate ensüümide nullmutantides on näha efekte, mida teised ensüümid täielikult ei kompenseeri.

Ka rpsO mRNA lagundamisel on nähtud RNAas R-i osalust (Andrade *et al.*, 2009). rpsO geen kodeerib ribosoomi valku S15. Põhiline rada, millega rpsO mRNA hävitatakse, algab RNAas E poolt tehtud endoribonukleolüütilise lõikega, ent kui RNAas E rakust puudub või on rpsO transkript muteerunud nii, et RNAas E seda ära ei tunne, käivitub teine lagundamisrada, mis sõltub polü(A) järjestuse olemasolust rpsO mRNA 3' otsas. Siis on rpsO transkripti lagundamisel nähtavasti kõige suurem roll RNAas R-l, kuigi väike osa on ka PNPaasil.

CsdA on arvatav helikaas, mis on konserveerunud nii bakterites kui ka inimeses. Arvatakse, et see osaleb ribosoomide biogeneesis, mRNAde lagundamises, translatsiooni initsiatsioonis ja geeniregulatsioonis (<http://www.uniprot.org/uniprot/P0A9P6>). Awano ja kaastöölised (2007) on uurinud lähemalt CsdA valgu funktsioone külmašoki (15°C) ajal, kus ilma selleta ei suuda bakterid kasvada. Nad on jõudnud järeldusele, et külmašokis rakkudes on vajalik CsdA osalus mRNA lagundamises ning et selleks on vaja selle helikaasset aktiivsust. Huvitaval kombel avastasid nad, et RNAas R suudab osaliselt seda funktsiooni CsdA nullmutandis komplementeerida. Globaalsed transkriptide profiilid 15°C juures kasvanud Δ csdA ja Δ rnrtüvedest on näidanud, et leidub nii mRNAid, mille hulka mõlemad ensüümid samamoodi mõjutavad, kui ka selliseid mRNAid, mida reguleerib vaid RNAas R või CsdA (Phadtare, 2012).

1.2.4.3. Ribosoomide kvaliteedikontroll

Kuna kaksikmutatsiooniga Δ rnrt Δ pnp tüvi ei ole eluvõimeline (Cheng *et al.*, 1998), kontrollisid Cheng ja Deutscher (2003) RNAas R-i ja PNPaasi puudumisest tingitud efekte Δ rnrt ja pnp^{ts} (temperatuuritundlik PNPaasi geen) tüve abil. Leiti, et 31°C juures, kus PNPaas oli rakus olemas, rakud kasvasid, ent 42°C juures ei suutnud rakud jaguneda ning surid. Pärast nelja tundi 42°C juures oli 70S ribosoomide hulk rakkudes drastiliselt langenud ning ribosoomide kokkupanemine häiritud. Rakkude RNA uurimisel avastati, et umbes pärast kahte tundi 42°C juures ilma RNAas R-i ja PNPaasita hakkas kuhjuma tavalisest lühemaid rRNA molekule nii, et aja möödudes kasvas puudulike molekulide hulk ning vähenes normaalsete rRNAde kogus. 16S rRNA näis olevat lühem 3' otsast ning 23S rRNA defektseid molekule oli tavalisest lühemaid nii 3' kui ka 5' otsast. Sama ei täheldatud ei metsiktüüpi tüves ega pnp^{ts} Δ rnrt tüves 31°C juures. Seega on Cheng ja Deutscher (2003) välja pakkunud mehhanismi, mille kohaselt RNAas R ja PNPaas lagundavad rakkudes tekkivad defektsed

rRNA molekulid nii, et need ei sega RNA metabolismi ja translatsiooni. Selle mudeli järgi täidavad RNAas R ja PNPaas selles protsessis sama funktsiooni, ühe ensüümi kadumisel ei häiru veel puudulike rRNAde lagundamine.

Jacobi ja kaasautorite (2013) poolt on avastatud ribosoomide kvaliteedikontrolli rada, kus RNAas R koostöös YbeY-ga lagundab 70S ribosoomi, millel on puudulik 30S alamühik, vt lähemalt alapeatükist 1.3.4.4.

1.2.4.4. Ribosoomide lagundamine

Näljastressis toimub ribosoomide lagundamine teistsuguse mehhanismi abil kui kasvavate rakkude defektsete rRNAde lagundamisel kvaliteedikontrolli rajas (Basturea *et al.*, 2011). On võrreldud $pnp^{\Delta} \Delta rnb \Delta rnr$ tüve RNAde, kust on 42°C juures puudu nii PNPaas, RNAas II kui ka RNAas R, metsiktüüpi tüve RNAga nii glükoosi olemasolul söötmes kui ka selle puudumisel, mis tekitab näljastressi. Seejuures on avastatud, et $pnp^{\Delta} \Delta rnb \Delta rnr$ tüves toimub mõlemal tingimusel lühemate rRNA molekulide fragmentide kuhjumine, kuid eri tingimustel on tekkivad fragmendid erinevad. Seda võib põhjustada erinevate endoribonukleaaside osalemine eri protsessides või erinev nukleaaside juurdepääs lõikekohtadele ribosoomide alamühikutes eri tingimustel. Pulsimärke analüüsi (*pulse-chase analysis*) põhjal on tehtud kindlaks, et näljastressis rakkudes lagundatakse ribosoomi, mis olid olemas enne stressi algust, ent ribosoomide kvaliteedikontrolli käigus lagundatakse värskelt sünteesitud puudulikke ribosoomi nende biogeneesi käigus (Basturea *et al.*, 2011; Cheng ja Deutscher, 2003). Näljastressis rakkudes osalevad ribosoomide lagundamisel põhiliselt RNAas II ja RNAas R, kuid konstantse kasvu tingimustes osalevad ribosoomide kvaliteedikontrollirajas RNAas R ja PNPaas, nagu on näidanud ka Cheng ja Deutscher (2003). Peale selle näitab nende lagundamisprotsesside erinevust ka RNAas PH oluline roll ribosoomide lagundamisel näljastressis, samas kui ribosoomide kvaliteedikontrolli rajas see ei osale (Basturea *et al.*, 2011).

1.2.4.5. Trans-translatsioon

Trans-translatsioon on protsess, mille käigus päästetakse mRNAle kinni jäänud ribosoomid vabaks. Selleks on kindlasti vaja tmRNAde, millel on nii transpordi- kui ka informatsiooni-RNA omadused, ning valku SmpB, mis aitab sellel ribosoomile seonduda. *Trans*-translatsiooni käigus sünteesitakse vigase peptiidi C-terminaalsesse otsa aminohapete järjestus, mis suunab selle valgu lagundamisele. On näidatud, et ka RNAas R puhastub välja koos tmRNA ja SmpB-ga (Karzai ja Sauer, 2001). Cairrão ja kaasautorid (2003) on näinud, et RNAas R nullmutandis stabiliseerub külmašoki ajal (10°C) tmRNA eellasmolekul, samas kui

metsiktüüpi tüves ja RNAas R-i kodeeriva plasmiidiga Δ nrn tüves seda ei toimu. Need andmed viitavad sellele, et RNAas R osaleb külmašoki ajal küpse tmRNA molekuli valmimisel. Kuid RNAas R osaleb ka otseselt *trans*-translatsioonil, lagundades defektseid mRNAsid, mille külge ribosoomid kinni on jäänud (Richards *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2010). Selleks on vajalik aktiivse *trans*-translatsiooni toimumine ehk puudulike mRNAd lagundamiseks on rakus vaja peale RNAas R-i ka tmRNAd ja SmpB valku. RNAas R lagundab nii mRNAsid, millel ei ole lugemisraamisest stoppkoodonit, kui ka neid, millele ribosoom jääb peatuma mitme järjestikkuse haruldase koodoni olemasolu tõttu. Normaalseid mRNAsid RNAas R selle protsessi käigus ei lagunda (Richards *et al.*, 2006). Ge ja kaasautorid (2010) on kindlaks teinud, et puudulike mRNAd lagundamiseks *trans*-translatsiooni käigus on vaja, et RNAas R seonduks ribosoomiga oma lüsiinirikka C-terminaalse regiooni kaudu. tmRNA ja SmpB on vajalikud just selles etapis, sest nende olemasoluta ei tunne RNAas R defektsetele mRNAdel kinni jäänud ribosoomi ära. Seega on avastatud, et *trans*-translatsiooni protsessis on olemas ka kolmas tähtis komponent - puudulike mRNA molekulide lagundamine, et need ei saaks uuesti töövõimelisi ribosoomi kinni püüda ja normaalset translatsiooni segada. Selles protsessis on otsustav roll RNAas R-il.

1.2.5. RNAas R-i regulatsioon

1.2.5.1. RNAas R-i mRNA valmimine

Külmašoki tingimustes transkribeeritakse rnr geen operonist koos külgnevate geenidega (Cairrão *et al.*, 2003). yjeB geen asub rnr geenist ülesvoolu ning yifH ja yifI geenid allavoolu. 37°C juures on tuvastatud aga ainult yjeB ja rnr geene sisaldava transkripti olemasolu. Seda arvesse võttes on Cairrão ja Arraiano (2006) oletanud, et 37°C juures peab toimuma mingisugune post-transkriptsiooniline sündmus, mille tõttu valmib just selline kotranskript. Nad on avastanud, et sellise transkripti valmimise eest vastutab peamiselt RNAas E ning näib, et ka RNAas G võib osaleda vaheproduktide lagundamisel pärast seda, kui RNAas E on algsed lõiked teinud (Cairrão ja Arraiano, 2006).

1.2.5.2. Kasvufaasi ja keskkonna mõju

RNAas R-i hulk kasvab statsionaarses faasis vähemalt kaks korda, võrreldes eksponentsiaalse kasvufaasiga (Andrade *et al.*, 2006; Chen ja Deutscher, 2005). RNAas R-i aktiivsus kasvab nii statsionaarsesse faasi jõudmisel kui ka kaua statsionaarses faasis viibides. See võib olla seotud aeglasema kasvukiirusega, sest ka aeglasemalt kasvavates eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes on RNAas R-i rohkem ja selle aktiivsus suurem (Chen ja Deutscher, 2005). RNAas R-i hulga kasv statsionaarses faasis ei ole tingitud rnr transkriptide suuremast kogusest.

Vastupidi, RNAas R-i mRNA hulk väheneb umbes 85% võrra (Chen ja Deutscher, 2010). Chen ja Deutscher (2010) on avastanud, et RNAas R-i hulka rakkudes erinevates kasvufaasides reguleeritakse tema stabiilsuse kaudu ning seda ei mõjuta RpoS ega (p)ppGpp olemasolu rakkudes. Eksponentsiaalses faasis on RNAas R-i pooleluiga umbes 10 minutit, kuid statsionaarses faasis on RNAas R-i hulk stabiilne ega vähene vähemalt nelja tunni jooksul. RNAas R on samamoodi stabiilne ka minimaalsöötmes kasvades ning külmašoki tingimustes.

Ka näljastressis olevates rakkudes tõuseb RNAas R-i aktiivsuse tase (Chen ja Deutscher, 2005). RNAas R-i aktiivsuse kasvu nähti nii süsiniku-, lämmastiku- kui ka fosforinäljas rakkudes, vastavalt 1,4; 2 ja 4 korda. Tundub, et rakkude vastus igale tingimusele võib olla spetsiifiline, kuna eri toitainete puudumisel on RNAas R-i hulga kasv erinev.

RNAas R on külmašoki valg. Pärast rakkude viimist 10°C juurde kasvab RNAas R-i hulk neis umbes seitse kuni kaheksa korda ning hiljem uuesti 37°C juurde viies RNAas R-i hulk väheneb. Esimese tunni jooksul külmašoki tingimustes kasvab rnr transkripti kogus umbes 100 korda, kuid külmašokiga kohanemise ajal see jällegi väheneb. Ka transkriptide pooleluiga kasvab 2,7 minutilt 37°C juures 93 minutile 10°C juures, seega on rnr transkriptid külmašoki tingimustes stabiilsemad kui 37°C juures. RNAas R-i olulisust külmašoki tingimustes näitab ka Δ rnr tüve fenotüüp: rakkude kolooniad on märgatavalt väiksemad kui kolooniad metsiktüüpi tüves ning Δ rnr tüves, kus RNAas R on plasmiidilt ekspresseeritud (Cairrão *et al.*, 2003). Sarnaseid tulemusi on näinud ka Chen ja Deutscher (2005).

Kuumašoki mõju RNAas R-le ei ole nii märgatav kui külmašoki oma (Chen ja Deutscher, 2005). 42°C juures ei tõusnud RNAas R-i aktiivsus rakkudes eriti ja 45°C juures tõusis see umbes kaks korda. Ometi ei pruugi see efekt olla spetsiifiline vastus kuumašokile, vaid hoopis aeglasemale kasvukiirusele 45°C juures.

1.2.5.3. tmRNA ja SmpB roll RNAas R-i regulatsioonis

Peale selle, et RNAas R aitab *trans*-translatsiooni käigus defektseid mRNA molekule lagundada, aitab selles protsessis osalemine ka tal endal lagundamist vältida. Nimelt on selgunud, et eksponentsiaalses kasvufaasis ribosoomidega seondunud RNAas R on täiesti stabiilne, samal ajal kui rakus vabalt esineva RNAas R-i pooleluiga on vaid umbes kaks minutit (Liang ja Deutscher, 2013). Eelnevalt nähtud pooleluiga 10 minutit tuleneb seega nende kahe vormi erinevast stabiilsusest. Eksponentsiaalses kasvufaasis on ribosoomidega seondunud umbes 80% kogu RNAas R-i hulgast ning selleks interaktsiooniks on vajalik tmRNA ja SmpB osalus ning *trans*-translatsiooni toimumine. Selleks ei ole vaja RNAas R-i

katalüütilist aktiivsust – ka mutantne RNAas R, mis ei ole võimeline puudulikku mRNA-d lagundama, suudab ribosoomile seonduda ning on seejäres stabiliseeritud. RNAas R interakteerub ribosoomile seondudes otse ribosoomivalguga S12. Liang ja Deutscher (2013) on oletanud, et RNAas R on kogu *trans*-translatsiooni protsessi jooksul seotud tmRNA-ga ja SmpB valguga ning jääb nendega seotuks ka pärast selle lõppu ja ribosoomist eraldumist.

Vaba RNAas R-i lühike pooleluiga eksponentsiaalses faasis on tingitud spetsiifilisest lagundamismehhanismist, mida vahendavad samuti tmRNA ja SmpB valgud (Liang ja Deutscher, 2013). Nimelt seonduvad tmRNA ja SmpB RNAas R-i C-terminaalse regiooniga (Liang ja Deutscher, 2010), kui RNAas R-i üks teatud lüsiinijääk, Lys-544, on atsetüleeritud ensüümi Pka (YfiQ) poolt (Liang *et al.*, 2011). tmRNA ja SmpB seondumine sinna stabiliseerib omakorda interaktsioone RNAas R-i N-terminaalse regiooni ja Lon ja HslUV proteaaside vahel, mis viivad RNAas R-i proteolüüsini (Liang *et al.*, 2011; Liang ja Deutscher, 2012b).

Statsionaarses faasis ei ole RNAas R ribosoomidega seotud (Liang ja Deutscher, 2013), kuid on täiesti stabiilne. See tuleneb Lys-544 atsetüleeriva ensüümi Pka (YfiQ) puudumisest statsionaarse faasi ajal (Liang ja Deutscher, 2012a). Seega ei atsetüleerita Lys-544 ning tmRNA ja SmpB ei seonu tugevalt RNAas R-ga ega ole soodustatud ka RNAas R-i proteolüüs Lon ja HslUV proteaaside poolt (Liang *et al.*, 2011; Liang ja Deutscher, 2012b). Ka külmašoki ajal puudub rakkudest Pka, seetõttu on RNAas R siis stabiilne (Liang ja Deutscher, 2012a). Hetkel ei ole teada, kuidas on Pka hulk rakus reguleeritud.

1.2.6. RNAas R-i homologid teistes organismides

Mõnes organismis on olemas mitu RNR perekonda kuuluvat RNAasi, mõnes aga vaid üks. Näiteks inimese patogeenis *Salmonella typhimurium* on kaks RNR perekonda kuuluvat eksoribonukleasi, millest üks on RNAas II homolog, teine aga RNAas R-i homolog (Domingues *et al.*, 2009). Samas *Streptococcus pneumoniae*'s on iseloomustatud vaid üks RNR perekonna liige, mis suudab sekundaarstruktuuriga RNAsid lagundada ja on seega RNAas R-i homolog (Domingues *et al.*, 2009). *S. pneumoniae*'s indutseeritakse RNAas R külmašoki tingimustes (Moreira *et al.*, 2012). *Mycoplasma*'st on samuti leitud vaid üks eksoribonukleas, RNAas R. Seega võib see saada mükoplasmaplastide ravimite sihtmärgiks (Zuo ja Deutscher, 2001). *Mycoplasma genitalium*'i RNAas R-il on nii *E. coli* RNAas II kui ka RNAas R-i omadusi ja see suudab nii RNAd protsessida kui ka lagundada (Lalonde *et al.*, 2007). Näiteks protsessib see tRNA-d 3' otsa, tundes ära nii järjestuste kui ka struktuuride motiive (Alluri ja Li, 2012). Huvitaval kombel on see tundlik riboosi metüleerimise suhtes

(Lalonde *et al.*, 2007). Ka halofiilsetele arhedele on RNAas R väga oluline, sest see on neis ainus olemasolev eksoribonukleas. *Haloferax volcanii* RNAas R on eriline ensüüm, sest 37°C juures käitub see nagu RNAas II *E. coli*'s: on tundlik RNA sekundaarstruktuuride suhtes ning vabastab nelja nukleotiidi pikkusi lõpp-produkte. Ent 42°C juures, *Haloferax volcanii* optimaalse kasvutemperatuuri juures käitub see nagu RNAas R ja suudab sekundaarstruktuuridega RNAd lagundada. Seega on see esimene kirjeldatud ensüüm, mille eksoribonukleolüütiline aktiivsus sõltub temperatuurist (Matos *et al.*, 2012).

RNAas R on paljudes bakterites seotud virulentsusega. Näiteks on *Shigella* liikides vacB geen, mis kodeerib RNAas R-i (Cheng *et al.*, 1998), olemasolu vajalik virulentsusgeenide ekspressiooniks, ilma selleta kaob nende võimekus siseneda infektsiooni käigus epiteelirakkudesse (Tobe *et al.*, 1992). *Aeromonas hydrophila* RNAas R on külmašoki valk, mis on sellele organismile vajalik kasvuks 4°C juures. RNAas R nullmutandi liikuvus väheneb ning see on hiire letaalsusmudelil vähem virulentne kui metsiktüüpi tüvi. Seega võib arvata, et RNAas R moduleerib mingil määral *A. hydrophila*'s virulentsust (Erova *et al.*, 2008). *Helicobacter pylori* RNAas R-i mRNA hulk rakus tõuseb madalamatel temperatuuridel ja kõrgema pH tingimustes. See osaleb kemotaksise, liikuvuse ja apoptoosi indutseerivate geenide posttranskriptsioonilises regulatsioonis, mõjutades nii *H. pylori* virulentsust (Tsao *et al.*, 2009). Samas on avastatud, et *Brucella abortus*'es, zoonootilises patogeenis, ei mõjuta RNAas R-i puudumine virulentsust (Miyoshi *et al.*, 2007), nii et RNAas R-i rolli virulentsuse regulatsioonis peaks arvatavasti iga organismi puhul eraldi kindlaks määrama.

RNAas R osaleb RNA metabolismis erinevates organismides eri moel. On avastatud, et *Pseudomonas syringae* RNA lagundamisel osaleb RNAas R PNPaasi (nagu *E. coli*'s) asemel degradatsioon (Purusharth *et al.*, 2005). Kuigi *P. syringae* RNAas R ei ole külma poolt indutseeritud, on see hädavajalik külmašokis ellu jäämiseks (Purusharth *et al.*, 2007) ning on psührofiilne ensüüm (Sulthana *et al.*, 2011). Selles organismis näib RNAas R osalevat 16S ja 5S rRNA 3' otsa protsessimises (Purusharth *et al.*, 2007). Fakultatiivses rakusiseses patogeenis *Legionella pneumophila* on RNAas II perekonnast olemas vaid RNAas R ning selle roll on tähtsam just külmašoki tingimustes, ilma selleta hakkavad kuhjuma sekundaarstruktuuridega RNA lagundamise vaheproduktid. Huvitaval kombel kasvab RNAas R nullmutandis ka kompetentsuse reguloni ekspressioon, mis ei sõltu varasemalt teadaolevatest regulaatoritest (Charpentier *et al.*, 2008). *Pseudomonas putida* RNAas R mängib olulist rolli mRNAde lagundamisel 30°C juures, kus on selle organismi optimaalne kasvutemperatuur, kuigi selle puudumine ei vähenda *P. putida* kasvukiirust. Huvitaval kombel on RNAas R nullmutandi liikuvus suurem kui metsiktüüpi tüvel. See on kooskõlas transkriptomuutustega, millest

on näha, et RNAas R osaleb paljude viburiaparaadiga seotud transkriptide lagundamisel (Fonseca *et al.*, 2008). RNAas R-i homoloog on olemas ka *Arabidopsis thaliana* kloroplastides, kus see osaleb 16S, 23S ja 5S rRNAde valmimisel (Bollenbach *et al.*, 2005). Koos PNPaasiga osaleb RNAas R ka kloroplasti mRNAde 3' otste valmimisel (Germain *et al.*, 2012).

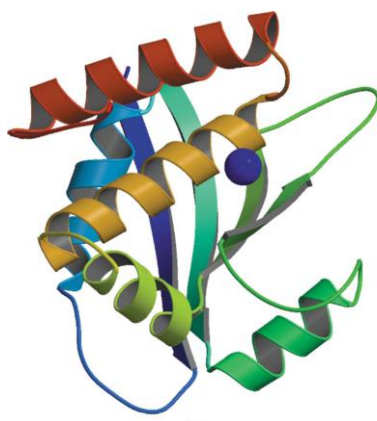
Ka teistes organismides peale *E. coli* on leitud andmeid RNAas R-i ja tmRNA-SmpB seotuse kohta. *Streptococcus pneumoniae*'s on nähtud, et SmpB valgust hulk reguleerib RNAas R-i hulka rakkudes ning *rnr* ja *smpB* kotranskribeeritakse (Moreira *et al.*, 2012). *Caulobacter crescentus*'es on avastatud, et tmRNA hulk sõltub rakutsükli faasist: varrega rakkudes (*stalked cells*) lagundab RNAas R vaba tmRNA, mis ei ole SmpB valguga seotud. Muidu kaitseb SmpB-ga seondumine tmRNA-d RNAas R-i poolt lagundamise eest (Hong *et al.*, 2005). Peale selle on nähtud, et *C. crescentus*'es on tmRNA-SmpB ja RNAas R tsütoplasmas ruumiliselt lahutatud (Russell ja Keiler, 2009). Prokarüootses mudelorganismis *Bacillus subtilis*'es asub *rnr* geen *ssrA* ja *smpB* geenidega samas klastris, kuid selle osaluse kohta trans-translatsioonil ei ole andmeid (Shin ja Price, 2007). RNAas R-i nullmutandil ei ole erilist fenotüüpi (Shin ja Price, 2007), kuid on siiski nähtud, et RNAas R suudab mRNAid lagundada (Oussenko *et al.*, 2005). Campos-Guillén ja kaasautorid (2010) on oletanud, et RNAas R võib *B. subtilis*'es osaleda tRNA^{Cys} kvaliteedikontrollis.

1.3. YbeY *Escherichia coli*'s

YbeY on väga konserveerunud endoribonukleaas, mis kuulub YbeY valguperekonda. YbeY valku kodeerib geen ybeY. *E. coli* YbeY pikkus on 155 aminohapet ning molekulmass 17 526 Da. Selle aminohappeline järjestus on kättesaadaval Swiss-Prot andmebaasis ligipääsunumbri P0A898 abil. YbeY valguperekond (Pfam andmebaasis UPF0054 valguperekond) on bakterites väga konserveerunud. YbeY homolooge leidub enamikus bakterite hõimkondades ning isegi eukarüootides. YbeY kuulub ka minimaalsesse bakteri tuumikgenoomi, mis on määratud bioinformaatiliste võtetega, võrreldes kõige väiksemate rakuliste parasiitide ja mudelorganismide genoome (Gil *et al.*, 2004). YbeY nullmutant kasvab võrreldes metsiktüüpi tüvega aeglasemalt ning on tundlikum erinevate stressitingimuste suhtes (Jacob *et al.*, 2013).

1.3.1. YbeY ehitus

E. coli YbeY kolmemõõtmeline kristallstruktuur on määratud lahutuvusega 2,7 Å. Selle uurimisel on avastatud, et YbeY struktuur koosneb kuuest α -heeliksist ja neljast β -lehest järjekorras β - α - α - β - α - β - α - α (vt joonis 4). Samuti on leitud, et YbeY sisaldab metalliiooni, mida koordineerivad His114, His118 ja His124. Arvatava neljanda sideme annab metalliioonile ilmselt vee molekul. Seega on YbeY metalloproteiin. Esialgsete tulemuste järgi on metalliiooniks Ni^{2+} , ent tuleb arvestada, et tetrahedraalne geomeetria Ni^{2+} ja His-tüüpi ligandide vahel on ebatavaline ning stõhhiomeetria on väiksem kui 1:1 (Zhan *et al.*, 2005). Swiss-Proti andmebaasis on homoloogia alusel metalliiooniks ennustatud hoopis Zn^{2+} (Yeh *et al.*, 2005).



Joonis 4. YbeY valgu tertsiaarstruktuur (Zhan *et al.*, 2005). Sinine kera tähistab metalliiooni asukohta.

Peale selle on uuritud ka YbeY aminohappelist järjestust, kasutades mitme järjestuse joonduse meetodit (MSA - *Multiple Sequence Alignment*). Leiti, et metalli siduvad histidiini jäägid ja nendega külgnevas lõhes paiknevad Arg59, Lys61, Asn66 ja Ser69 jäägid on erinevates

organismides identsed või esineb seal väga vähe asendusi. Seega arvati, et need aminohappejäägid võivad olla funktsionaalselt olulised (Zhan *et al.*, 2005). Selle järelduse tõestamiseks ekspresseeriti YbeY nullmutandis plasmiididelt ülehulgas YbeY valku, millel olid eri tüvedes erinevad punktmutatsioonid. Avastati, et kasvu ei suutnud komplementeerida tüved, kus His114 ja Arg59 olid muudetudalaniiniks. Ent see ei pruugi tähendada, et teised konserveerunud jäägid ei ole *in vivo* YbeY funktsioonide täitmiseks nii olulised kui His114 ja Arg59. Nende kasvu komplementeeriv funktsioon võib olla oluline metsiktüüpi tüves oleva tavalise YbeY hulga puhul (Davies *et al.*, 2010). Hiljuti on avastatud, et His114 ja Arg59 on olulised YbeY RNAasse aktiivsuse seisukohast (Jacob *et al.*, 2013).

1.3.2. YbeY on endoribonukleaas

Kuna YbeY omab metallohüdrolaasilaadset struktuuri, otsustati kontrollida hüpoteesi, et YbeY on RNAas, mis osaleb otse RNA lõikamisel (Jacob *et al.*, 2013). Selleks viidi läbi *in vitro* katsed sünteetiliste oligonukleotiididega, mis imiteerivad 16S rRNA protsessimata eellasmolekuli 3' otsa. Avastati, et YbeY on võimeline lõikama üksikahelalist RNAd ja juuksenõelastruktuure (mitte juuksenõela tüvest), kuid mitte kaheahelalist RNAd. YbeY lõikab RNAd eelistatult uratsiili jäägi järel nukleotiidahela keskelt – seega on YbeY endoribonukleaas. Produktidele jäävad lõikekohtade 5' otsa hüdroksüülrühm ja 3' otsa fosfaatrühm. YbeY on võimeline lõikama oligonukleotide, mis on pikemad kui 10 nt, kuid 7-nukleotiidilist substraati see enam lõigata ei suuda. YbeY RNAasne aktiivsus säilib ka 45°C juures, kuid 65°C juures hakkab see juba vähenema. YbeY RNAasse aktiivsuse jaoks on olulised aminohappejääkide H114 ja R59 olemasolu. YbeY suudab *in vitro* lagundada väga efektiivselt rRNAd ja mRNAd, kuid mitte tRNAd (Jacob *et al.*, 2013).

1.3.3. YbeY on kuumašoki valk

YbeY geeni ybeY deletsioon metsiktüüpi tüvest toob kaasa väga pleiotroopse fenotüübi. YbeY nullmutandi kasv aeglustub rikkal söötmel ning see on tundlik erinevate stressitingimuste suhtes, näiteks β -laktaamsete antibiootikumide juuresolu, temperatuuri tõusu ja oksüdatiivse stressi suhtes (Davies *et al.*, 2010).

Kuumašoki ajal reguleerib *E. coli* rakkudes transkriptsiooni alternatiivne sigma-faktor σ^{32} . σ^{32} mõjualuse reguloni uurimisel avastati, et ka ybeY kuulub kuumašokist mõjutatavate geenide hulka, seega on YbeY kuumašoki valk (Nonaka *et al.*, 2006). Rasouly ja kaasautorite tehtud tööst (2009) nähtub, et metsiktüüpi tüve mutantne vorm, milles puudub YbeY aktiivsus, on väga tundlik temperatuuri tõusu suhtes. Seega sarnaneb YbeY tuntud kuumašoki valkudele, mille funktsioonid muutuvad rakkude jaoks hädavajalikuks, kui temperatuur

tõuseb. Lisaks uuriti, millist protsessi YbeY kuumašoki ajal rakkudes mõjutab. Kuna YbeY nullmutandis ei leitud suuremat valguagregaatide hulka kui metsiktüübis ega ka suurenenud *chaperonide* ja proteaaside ekspressiooni, ei ole YbeY tõenäoliselt seotud valkude kvaliteedikontrolli rajaga. Küll aga avastati, et kui ekspresseerida nii metsiktüüpi tüves kui YbeY nullmutandis plasmiidilt LacZ valku, siis YbeY nullmutandis oli selle hulk märgatavalt väiksem kui metsiktüüpi tüves ning valku oli nullmutandis kuumašoki ajal (42°C) tunduvalt vähem kui 37°C juures. LacZ transkripti leidus eri tüvedes aga samaväärsetes kogustes. Seega järeldati, et YbeY on rakkudele oluline just translatsiooni, mitte transkriptsiooni seisukohast ning mõjutab translatsiooni ka tavatingimustes, kuid eluliselt tähtsaks muutub kuumašoki tingimustes. Seda järeldust toetas ka avastus, et 37°C juures on YbeY nullmutantides polüsoomide hulk väiksem kui metsiktüüpi tüves, mis tähendab, et selles tüves on aktiivset translatsiooni vähem (Rasouly *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2010). Hilisemad katsed lutsiferaasi transleerimisega *in vitro* süsteemis on näidanud, et $\Delta ybeY$ tüve translatsiooni masinavärki kasutades tekkis lutsiferaasi umbes 8 kuni 9 korda vähem kui metsiktüüpi tüve translatsiooni masinavärki kasutades (Rasouly *et al.*, 2010).

1.3.4. YbeY võimalikud funktsioonid

YbeY valgust on veel suhteliselt vähe teada. Viimasel ajal on hakatud seda intensiivsemalt uurima, sest arvatakse, et YbeY suure konserveeruvusega käib kaasas ka rakkude elutegevuse seisukohast oluline funktsioon. Senimaani on leitud palju seoseid YbeY ning rRNA metabolismi vahel, kuid täpseid mehhanisme veel kirjeldatud ei ole. Järgnevalt on kirjeldatud tähtsamaid protsesse, milles YbeY arvatakse osalevat, ning tõendusmaterjali, mis sellele viitab. Tuleb siiski tõdeda, et tulemustesse tuleks suhtuda ettevaatlikult seni, kuni on läbi viidud rohkem katseid, et YbeY rolli nendes protsessides täpsemalt kirjeldada.

1.3.4.1. rRNA transkriptsiooni antiterminatsioon

Antiterminatsiooni toimumist on vaja selleks, et vältida RNAP ning transkriptsiooni peatumist terminaatoralade ja –faktorite (näiteks Rho-faktor) tõttu ning tagada allavoolu geenide ekspressioon. Selles protsessis osalevad antiterminatsioonifaktorid, mis võivad regulatoorse signaali ajal aidata RNAPl mööduda ühestainsast terminaatorist või hoopis suurendada RNAP protsessiivsust. rRNA geenide transkriptsioonil *rrn* operonilt osalevad antiterminatsioonifaktorid NusA, NusB ja NusG koos r-valkudega S4 ja S10, mis takistavad transkriptsiooni peatumist Rho-sõltuval terminaatoril (Santangelo ja Artsimovitch, 2011).

Grinwald ja Ron (2013) on uurinud rRNA antiterminatsiooni LacZ geeni mRNA mudelsüsteemis, kasutades erineva pikkusega *rrn* operoni promootorjärjestusi ja võrreldes

LacZ transkriptide hulka metsiktüüpi tüves ja YbeY nullmutandis. Juhul kui promootoris oli olemas antiterminatsiooniala, toimus $\Delta ybeY$ tüves umbes 100-kordne transkriptsiooni vähenemine võrreldes metsiktüüpi tüvega. Transkriptide stabiilsus seejuures ei vähenenud. Need tulemused toetavad hüpoteesi, et YbeY osaleb antiterminatsiooni reguleerimises (Grinwald ja Ron, 2013).

YbeY osalemine rRNA transkriptsiooni antiterminatsioonil võib seletada ka selle vajalikkust kuumašoki puhul (Grinwald ja Ron, 2013). rRNA korrektseks valmimiseks ja voltumiseks on vajalik optimaalne transkriptsiooni kiirus, sest need protsessid toimuvad samaaegselt. Temperatuuri tõustes tõuseb ka transkriptsiooni elongatsiooni kiirus ning seega on antiterminatsiooni korrektne toimumine väga vajalik, et tagada normaalsete transkriptide teke.

1.3.4.2. Translatsioon

YbeY on seostatud translatsiooniga. On leitud, et YbeY ei ole rakus otseselt seotud ribosoomidega, vaid asub S100 fraktsioonis, mis sisaldab translatsiooni initsiatsiooni-, elongatsiooni-, vabanemis- ja taaskasutusfaktoreid ja tRNAde süntetaase. Ometi on YbeY nullmutandist saadud S100 fraktsioon translatsioonil peaaegu sama aktiivne kui metsiktüüpi tüve oma. $\Delta ybeY$ tüvest saadud ribosoomide kasutamisel *in vitro* ükskõik kumma S100 fraktsiooniga lõpeb aga väiksema efektiivsusega translatsiooniga. Metsiktüüpi tüve ja $\Delta ybeY$ tüve ribosoomi alamühikute ja S100 fraktsioonide eri kombinatsioone *in vitro* translatsioonil uurides leiti, et ebaefektiivsemat translatsiooni $\Delta ybeY$ tüves põhjustavad puudulikud 30S alamühikud (Rasouly *et al.*, 2010). Samale järeldusele on jõudnud ka Davies ja kaasautorid (2010), kes on uurinud põhjalikumalt YbeY puudumise mõju rRNA protsessimisele. Nad on avastanud, et lisaks polüsoomide hulga vähenemisele kasvab ka raaminihete ja *nonsense*-koodonite läbilugemiste arv, mis tähendab, et translatsiooni aktiivsus ja kvaliteet on vähenenud. Peale selle on leitud YbeY nullmutandist rohkem vabu 30S ja 50S alamühikuid, mis viitab osade alamühikute defektsusele – need ei suuda ühineda funktsionaalseks 70S ribosoomiks. Sellele viitavad ka andmed, mis näitavad, et YbeY nullmutandis leidub 30S alamühiku fraktsioonis märgatavalt vähem IF2, mis aitab 30S ja 50S alamühikul üksteisega seonduda, kui metsiktüüpi tüves (Davies *et al.*, 2010).

1.3.4.3. rRNA protsessimine

YbeY nullmutandi rRNA võrdlemisel metsiktüüpi tüve omaga leiti, et seal kuhjub 17S rRNA-d, mis on 16S rRNA eellasmolekul, ning 16S* rRNA-d, mis on lühem kui 16S rRNA ja mille tekkepõhjused ei ole veel selged. 16S* rRNA molekul võib olla nii 17S kui ka 16S valesti protsessimise või lagundamise produkt (Davies *et al.*, 2010.) Näib, et 16S* rRNA

puudub 3' otsast küpse 16S rRNA 3' otsa nukleotiidne järjestus, sest sellega komplementaarne 33-nukleotiidiline proov ei seonu hübridisatsioonil 16S* rRNAga (Jacob *et al.*, 2013). Nii 17S kui 16S* rRNA-d leiti 30S alamühikute koosseisust, ent 70S ribosoomidest leiti ainult 17S rRNA-d (Davies *et al.*, 2010). Arvatakse, et 17S rRNA takistab ribosoomi osana translatsiooni (Wireman ja Sypherd, 1974), nii et 17S osalus 70S ribosoomide moodustamisel YbeY nullmutandis võib seletada translatsiooni efektiivsuse vähenemist. Kuna 16S* rRNA-d 70S ribosoomidest ei leitud, järeldati, et see ei ole võimaline alamühikute seondumisel osalema ning on seega mittefunktsionaalne molekul. Samamoodi leiti YbeY nullmutandist ka 23S ja 5S mitteprotsessitud eellaseid, ent YbeY puudumine mõjutas negatiivselt siiski kõige enam 16S rRNA protsessimist. Seega järeldati, et YbeY osaleb otseselt või kaudselt rRNA molekulide valmimisprotsessis (Davies *et al.*, 2010). Sellele viitab ka fakt, et *in vitro* translatsiooniprotsessile, kus osaleb $\Delta ybeY$ tüvest pärit translatsioonimasinavärk, puhastatud YbeY valgu lisamisel ei taastu metsiktüübile omane translatsiooniline efektiivsus (Rasouly *et al.*, 2010). Hilisemad katsed on näidanud, et kuumašoki ajal (45°C) kaob umbes tunni jooksul $\Delta ybeY$ tüves 16S rRNA, kuid 17S ja 16S* rRNA hulk jääb umbkaudu samaks (Jacob *et al.*, 2013).

YbeY ja teiste rRNA valmimisel osalevate RNAaside vaheliste võimalike interaktsioonide olemasolu uurimiseks on uuritud tüvesid, kust oli puudu kas mõni muu RNAas või vastav RNAas ja YbeY (Davies *et al.*, 2010). Kõige negatiivsemat mõju 16S rRNA valmimisele 17S molekulist omas $\Delta ybeY$ tüvi. Kui lisaks YbeY puudus ka RNAas III aktiivsus, ei tekkinudki 17S rRNA-d – tekkisid 16S* ja 18S* rRNA molekulid. $\Delta ybeY \Delta rnr$ mutandi puhul, kus lisaks YbeY puudus ka RNAas R, vähenes 16S rRNA hulk tunduvalt ning selle võrra kasvas nii 17S kui ka 16S* kogus. See võib näidata, et YbeY puudumisel ei valmi 16S rRNA õigesti ning tekivad väärmolekulid, mida RNAas R normaalsel tingimustel lagundab. Nii $\Delta ybeY \Delta rnr$ kui $\Delta ybeY \Delta pnp$ mutantide puhul märgati väga vähest hulka normaalset 16S rRNA 3' otsa. See võib viidata faktile, et RNAas R ja PNPaas osalevad 16S rRNA molekuli 3' otsa valmimisel nii, et nende tööd moduleerib YbeY. Huvitavaks muudab selle avastuse asjaolu, et nende tüvede kasvukõverate uurimisel leiti aeglasem kasv ja pikem *lag* faas vaid $\Delta ybeY \Delta rnr$ mutandil, kusjuures $\Delta ybeY \Delta pnp$ mutant kasvas sama hästi kui $\Delta ybeY$ mutant ning Δrnr mutant sama hästi kui metsiktüüpi tüvi. Seega võib arvata, et YbeY ja RNAas R interakteeruvad rakkudes ka muude protsesside kui 16S rRNA valmimise käigus, näiteks rRNA kvaliteedi kontrollis.

Hüpoteesile, et YbeY osaleb otseselt 16S rRNA 3' otsa protsessimises, on leitud ka vastuolulisi andmeid. Sulthana ja Deutscher (2013) näitasid, et 16S rRNA 3' otsa valmimisel

osalevad eksoribonukleasid RNAas II, RNAas R, RNAas PH ning polünukleotiidfosforülaas (PNPaas). 16S rRNA 3' küps ots tekib neist ükskõik millise ensüümi olemasolul. Nende ensüümide puudumisel on näha 16S eellast, millel on olemas kõik 33 nt, mis on tekkinud rrn operoni algse transkripti lõikamisel RNAas III-ga. Siit on Sulthana ja Deutscher järeldanud, et on ebatõenäoline, et YbeY lõikaks otseselt 16S eellast, sest siis oleks näha mõnda vaheprodukti.

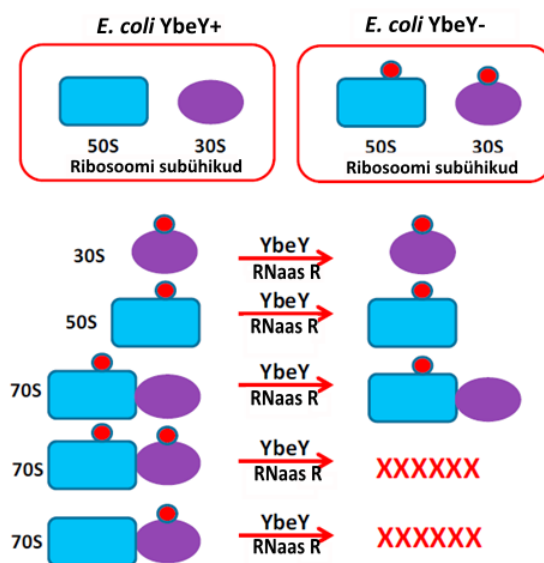
Ometi on nähtud, et YbeY on 16S rRNA 3' otsa valmimiseks vajalik (Davies *et al.*, 2010). Seega võib tema roll väljenduda hoopis 16S rRNA protsessimise õiges ajalises ja ruumilises regulatsioonis. Näiteks ei ole selge, kuidas suudab RNAas II lagundada 16S rRNA eellase 3' otsa, kui tal ei ole helikaasset aktiivsust nagu RNAas R-il ja PNPaasil (tänu eraldiseisvale helikaasile), et lahti harutada rRNAs leiduvaid sekundaarstruktuure. Samuti ei teata, kuidas 16S rRNA 3' otsa valmimisel osalevad eksoribonukleasid just õiges kohas peatuvad, eriti kui mõned neist on protsessiivsed ensüümid (Sulthana ja Deutscher, 2013). Seega ei ole YbeY täpsed toimemehhanismid rRNA protsessimisel veel teada.

1.3.4.4. Ribosoomide kvaliteedikontroll

Jacob ja kaasautorid (2013) on avastanud uue ribosoomide kvaliteedikontrollimehhanismi, mis toimib *E. coli*'s 70S ribosoomide tasandil. Selle kvaliteedikontrolli mudeli (vt joonis 5) valmimiseni on viinud katsed metsiktüüpi ja $\Delta ybeY$ tüvedest eraldatud 30S alamühikute ja 70S ribosoomidega. $\Delta ybeY$ tüve 30S alamühikud sisaldasid vähem küpset 16S rRNAd kui metsiktüüpi tüve omad ja kiiremalt liikuvaid RNAsid ning 70S ribosoomides leidis 17S rRNAd, vähem küpset 16S rRNAd ning samuti kiiremalt liikuvaid RNA molekule, mis ei ole 16S, seega ei olnud tegu normaalsete 30S alamühikutega. Erinevate töötluste puhul (YbeY, RNAas R, mõlemad RNAasid ja RNAas R kombineerituna mutantse YbeY valguga) *in vitro* oli näha, et metsiktüüpi tüve 30S ja 70S ning $\Delta ybeY$ tüve 30S rRNAd ei lagundatud. Lagundamine toimus vaid YbeY nullmutandi 70S ribosoomide puhul, kui reaktsioonisegusse lisati nii RNAas R kui YbeY. Kui koos RNAas R-ga kasutati YbeY valku, kuhu olid sisse viidud mutatsioonid H114A ja H124A, siis lagundamist ei toimunud. See tähendab, et ribosoomide kvaliteedikontrolli toimumise jaoks on vajalik YbeY katalüütiline aktiivsus.

Selle protsessi puhul on oluline see, et YbeY ja RNAas R suudavad lagundada nii mittetransleerivaid 70S ribosoomi kui ka defektseid ribosoomi, mis suudavad polüsoomidel transleerida, kuigi nende ribosoomide 30S alamühik on defektne (Jacob *et al.*, 2013). Isegi kui 50S alamühik on korrektselt kokku pandud ning töötab korralikult, lagundatakse ka see, kui see on seostunud defektse 30S alamühikuga. Jacob ja kaasautorid (2013) on välja pakkunud

kaks hüpoteesi: kas normaalne 50S alamühik lagundatakse, sest see on defektse 30S alamühiku vigase struktuuri tõttu sellega valesti seostunud või on see pärast vigase 30S alamühiku lagundamist destabiliseeritud.



Joonis 5. YbeY ja RNAas R koostöö ribosoomide kvaliteedikontrolli mudelis 70S ribosoomide tasemel. Lagundatakse vaid puuduliku 30S alamühikuga 70S ribosoomid (Warner, 2013).

1.3.4.5. Ribosoomide lagundamine

Arvatakse, et ribosoomide lagundamisel kehvade keskkonnatingimuste tõttu võib degradatsiooniprotsessi alustada endoribonukleaas (Deutscher, 2009). See teeb esimese löike ribosoomide RNAs, mille järel saavad eksoribonukleaasid rRNA fragmendid lõpuni lagundada. Senini ei ole vastavat endoribonukleaasi tuvastatud. Jacob ja kaastöölised (2013) on oletanud, et YbeY võib olla endoribonukleaas, mis koostöös RNAas R-ga lagundab defektseid ribosoomid. Ka Anton Paieri katsed (avaldamata andmed, TÜTI, Eesti) on näidanud, et ribosoomid, mida metsiktüüpi tüves lagundatakse, stabiliseeritakse YbeY nullmutandis. Hüpoteesi, et YbeY võib osaleda ribosoomide lagundamisel enne RNAas R-i ja teisi eksoribonukleaase, uuritakse ka käesoleva töö eksperimentaalses osas.

1.3.5. YbeY homologid teistes organismides

YbeY on bakterite seas väga konserveerunud valk. Selle homologe on leitud ka eukarüootidest. YbeY homologide kristallstruktuur on määratud veel hüpertermofiilist *Aquifex aeolicus* (Oganesyan *et al.*, 2003) ja inimese patogeenist *Haemophilus influenzae* (Yeh *et al.*, 2005).

SMc01113, YbeY homolog olemasolu sümbiootilises bakteris *Sinorhizobium meliloti* on hädavajalik sümbioosi toimumiseks. See sarnaneb järjestuselt ja struktuurilt eukarüootide

Argonaudi valkude MID domeenile. Näib, et sellel YbeY homologil on *S. meliloti*'s oluline roll geeniregulatsioonis, täpsemalt sRNAde regulatsioonis, nagu võib ka järeldada selle sarnasusest Argonaudi valkudega (Pandey *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Ribosoomide lagundamine on keeruline protsess, mille täpset mehhanismi pole senini kindlaks tehtud. Üks tundmatutest teguritest on oletatav endonukleaasne aktiivsus, mis võiks initsieerida ribosoomide lagundamise, nii et tekivad rRNA fragmendid, mida omakorda saavad lagundada eksoribonukleaasid (Deutscher, 2009). Hiljuti on hakatud intensiivselt uurima endoribonukleaasi YbeY, mis mõjutab ka rRNAde metabolismi (Rasouly *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2013). Anton Paieri tulemused (avaldamata andmed, TÜTI, Eesti) on näidanud, et tüves, milles puudub YbeY, stabiliseeruvad mutantsed ribosoomid, mida tavaliselt lagundatakse. Seetõttu on alust arvata, et YbeY võib olla päästikuks, mis vallandab ribosoomide lagundamise.

Käesolevas töös kasutatakse eelnevast erinevat katsesüsteemi, et uurida ribosoomide lagundamist *E. colis* eksoribonukleaasi RNAas R ja endoribonukleaasi YbeY puudumisel. Uuritakse ka valgusünteesi inhibeervate antibiootikumide kloramfenikooli ja erütromütsiini mõju ribosoomide lagundamisele vastavates tüvedes.

Meie töö laiem teaduslik eesmärk on vastata küsimusele

- Kas YbeY võib olla endoribonukleaas, mis initsieerib ribosoomide lagundamise, lõigates rRNAst fragmente, mida edasi lagundavad eksoribonukleaasid?

Eksperimentaalsete küsimustena, mis aitavad eelnevale küsimusele vastust leida, küsitakse

- Kas ribonukleaaside RNAas R ja YbeY puudumine mõjutab ribosoomide lagundamist?
- Kas antibiootikumide kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolu mõjutab RNAas R-i ja YbeY rolli ribosoomide lagundamisel?
- Kas antibiootikumide võime ribosoomide lagundamist soodustada võib olla osa nende toimemehhanismist rakkude kasvu inhibeermisel?

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved, oligonukleotiidid ja söötmed

Kõikides eksperimentides kasutati Keio isogeenset tüve BW25113 [*rrnB3*, Δ *lacZ4787*, *hsdR514*, Δ (*araBAD*)567, Δ (*rhaBAD*)568, *rph-1*], mis on K-12 derivaat (Baba *et al.*, 2006). Edaspidi kutsume seda tüve lihtsuse huvides Keio metsiktüüpi tüveks (Keio WT). RNAas R⁻ tüvi ning YbeY⁻ tüvi on Keio WT tüvega isogeensed, välja arvatud mutatsioonid Δ *rnR* ja Δ *ybeY*. Rakke kasvatati LB söötmel.

rRNA olemasolu tuvastamiseks kasutati kahte tüüpi oligonukleotiide, millele on konjugeeritud fluorestseeruvad ühendid Cy5 ja fluoretsiin. Cy5 detekteeritakse otseselt selle enda fluorestsentsi abil. Fluoretsiinile on aga seotud spetsiifiline antikeha, millega seotud reaktsioonide abil on oligonukleotiidi asukohta võimalik detekteerida kemoluminestsentsi abil. Kõik oligonukleotiidid on ostetud firmast Metabion ning ära toodud tabelis 2.

Tabel 2. Käesolevas töös kasutatud oligonukleotiidid.

Oligonukleotiid	Seondumisaik	Järjestus
23S-190-Fluo	23S rRNA nt 163-184	5'-Fluo-GGT TCG CCT CAT TAA CCT ATG G-3'
16S-1220-Fluo	16S rRNA nt 1995-1223	5'-Fluo-GCC CTG GTC GTA AGG GCC ATG ATG ACT TG-3'
23S-h25-Cy5	23S rRNA nt 527-551	5'-Cy5-CGC CTA AGC GTG CTC CCA CTG CTT G-3'
EUB338-Cy5	16S rRNA nt 338-356	5'-Cy5-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

2.2.2. Antibiootikumide minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni määramine

Katsealused tüved (RNAas R⁻ ja YbeY⁻ ning kontrolliks Keio metsiktüüpi (Keio WT) tüvi) inokuleeriti 3 ml LB söötmesse ning kasvatati 37°C juures loksutil üleöö, sellest tehti 50x lahjendus (60 µl üleööökultuuri 3 ml LB söötmesse) ning kasvatati 1 tund 37°C juures loksutil. Seejärel tehti LB söötmesse kahekordne lahjenduste rida antibiootikumidest kloramfenikool (CAM) ja erütromütsiin (Ery) (40 µg/ml...0,039 µg/ml) ning neid kanti 100 µl 96-kaevulise mikrotiiterplaadi kaevudesse. Kõige viimasesse veergu kanti ilma antibiootikumita LB söödett. Bakterikultuurist tehti 2000x lahjendus (10 µl bakterikultuuri 20 ml LB söötmesse) ning sellest 100 µl kanti mikrotiiterplaadi igasse kaevu. Mikrotiiterplaat sisestati mikrotiiterplaatide lugejasse Synergy MX (BioTek) ning rakke kasvatati 20 tundi 30°C juures,

kusjuures kultuuride optiline tihedus mõõdeti iga 15 minuti tagant. Katse viidi läbi vaid üks kord. Minimaalseks inhibitoorseks kontsentratsiooniks loeti kõige väiksem antibiootikumi kontsentratsioon, mille juures bakterikultuuri tihedus ei olnud ületanud optilist tihedust 0,1.

2.2.3. Kasvukõverate mõõtmine 37°C juures

Uuritavate tüvede (Keio WT, RNAas R⁻ ja YbeY⁻) kasvukõverad määrati samamoodi ettevalmistatud mikrotiiterplaadi proovide järgi, nagu seda oli tehtud antibiootikumide minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni määramisel. Erinevalt eelnevast aga ei sisaldanud need antibiootikume ning rakke kasvatati 24 tundi 37°C juures. Keio WT ja YbeY⁻ tüvede kasvukõverad arvutati kolme eksperimendi keskmisena, RNAas R⁻ tüve kasvukõver kahe eksperimendi keskmisena.

2.2.4. Ribosoomide lagundamise uurimise katsesüsteem

Ribosoomide lagundamise uurimiseks kasutati RNAas R⁻, YbeY⁻ ja Keio WT tüvesid ning lagundamise mustreid võrreldi kolmel eri tingimusel: kasv ilma antibiootikumide juuresoluta ning kasv kloramfenikooli ning erütromütsiini olemasolul söötmes. Katsed toimusid 30°C juures, sest eelkatsed näitasid, et 30°C juures oli lagundamise efekt selgemini jälgitav kui 37°C juures.

Keio WT, RNAas R⁻ ja YbeY⁻ värsketelt plaatidelt inokuleeriti igast tüvest kolm kolooniat kolme katseklaasi, mis sisaldas 3 ml LB söödet ning neid kasvatati 37°C juures loksutil üleöö. Üleööökultuurist tehti 250x lahjendus 400 ml LB söötmesse ning neid kasvatati 30°C juures kuni nende optiline tihedus oli umbes 0,3. Seejärel lisati igast tüvest ühele kultuurile kloramfenikooli, teisele kultuurile erütromütsiini ning kolmas kasvas edasi ilma antibiootikumi juuresoluta söötmes. Kloramfenikooli lõppkontsentratsioon söötmes oli 7 µg/ml ning erütromütsiinil 100 µg/ml, need antibiootikumide kontsentratsioonid peaksid avaldama ribosoomide lagundamisele sarnast mõju (Siibak *et al.*, 2009). Kultuure kasvatati veel 2 tundi 30°C juures; seejärel lisati söötmesse jääd, et see võimalikult kiiresti jahtuks ning ribosoomide hetkeolukord säiliks, ja rakud fuugiti 10 minuti jooksul 5 krpm kiirusel fuugis RC5B Plus (Sorvall, rootor SLA-1500) põhja. Supernatant eemaldati ning rakud suspendeeriti lüüsipuhvris (LP puhver, vt lisa 1) ning lüüsiiti rõhu abil masinaga MicroFluidizer EmulsiFlex C3 (Avestin). Seejärel fuugiti lüsaate 30 minuti jooksul 13 krpm kiirusel fuugis RC5B Plus (Sorvall, rootor SS-34), et need klaaruksid. Igat lüsaati lisati umbes 2 ml sahharoosigradientidele, mis olid eelnevalt ettevalmistatud. Selleks oli valmistatud 22% sahharoosi lahus 1x LLP puhvris (vt lisa 1) ning see ultratsentrifuugitopsides -80°C juures külmutatud. Sulades moodustus sahharoosigradient. Lüsaatidega gradiente fuugiti 17 tundi

20,4 krpm ($\omega^2t=2,8e11$) juures ultratsentrifuugis Optima L-90K (Beckman Coulter, rootor SW28). Fraktsioonid, mis sisaldavad erinevaid ribosoomi osakesi, eraldati kolmest masinast koosneva süsteemi abil. Sinna kuulus pump (Pump P-1, Amershan Biosciences), mis pumpab gradiendi proovi läbi spektrofotomeetri; spektrofotomeeter (Econo UV Monitor, BIO-RAD), mis mõõdab proovi optilist tihedust; ning isekirjutaja (Model 1327 Econo-Recorder, BIO-RAD), mis selle optilise tiheduse visualiseerib. Eraldatud fraktsioone uuriti edasi Northern bloti meetodil (vt 2.2.6.).

2.2.5. Ribosoomide fraktsioonide ettevalmistamine Northern bloti jaoks

Igale fraktsioonile lisati 2,5 mahtu 96% etanooli ning RNAI lasti sadeneda üleöö -20°C juures. Seejärel fuugiti proove 45 minutit 4 krpm juures fuugis 4K15 (Sigma) (rootor 11150) ning pesti 10 ml 70% etanooliga, misjärel fuugiti taas sama fuugiga kiirusel 4 krpm 10 minutit. Seejärel eemaldati etanool ja RNA sade võeti üles 200 µl MQ vees. Lisati 400 µl 1x LLP lahust (ka 200 µl lüsaatidele, mis olid seni külmutatult -20°C juures). Igale proovile (nii fraktsioonidele kui lüsaatidele) lisati 600 µl fenooli (pH=6,0) 1% SDS-s, raputati Vortexil ning fuugiti 10 minutit kiirusel 13,2 krpm 4°C juures fuugides 5415 R (Eppendorf, rootor F45-24-11) ja 1-14K (Sigma, rootor 12094)(samad parameetrid ka järgmistel fuugimistel). Saadud vesifaasile lisati 600 µl fenooli ja kloroformi (1:1) segu ning korrati raputamist Vortexil ja fuugimist. Taas eraldati vesifaas ning sellele lisati üks maht kloroformi, raputati Vortexil ning fuugiti. Seejärel lisati vesifaasile 2,5 mahtu 96% etanooli ning RNAI lasti sadeneda 1-2 tundi -20°C juures. Seejärel proove fuugiti ning sadet pesti 1 ml 70% etanooliga, misjärel toimus taas fuugimine. Etanool eemaldati ning RNA suspendeeriti 50 µl MQ vees, RNA lahuste optiline tihedus mõõdeti 260 nm juures spektrofotomeetriga Ultrospec 7000 (GE Healthcare) ning arvutati iga lahuse kontsentratsioon.

2.2.6. Northern blot

Northern blot on meetod, mida kasutatakse teatud RNA molekulide tuvastamiseks kogu RNA hulgast. See toimub tänu spetsiifiliste oligonukleotiidide hübridiseerumisele uuritava RNaga ning nendele oligonukleotiididele lisatud ühenditele, mis võimaldavad neid tuvastada fluorestsentsi või kemoluminestsentsiga. Kogu eraldatud RNA lastakse laiali denatureerival geelil ning kantakse sellelt üle nailonmembraanile. Hübridisatsioonil erinevate oligonukleotiididega on võimalik tuvastada, kui suur uuritav RNA on, sest vastavalt oma pikkusele jooksevad erinevad RNA molekulid geelil erinevale kaugusele. Käesolevas töös on kasutatud modifitseeritud Northern bloti protokoll, mis on välja töötatud Kasari ja kaasautorite (2010) poolt Trayhurn *et al.* (1994) järgi.

2.2.6.1. Geelelektroforees

Geelelektroforeesil kasutati 1,5% denatureerivat agarosgeeli, mis sisaldas 1x MOPS puhvrit (vt lisa 1) ja 2% formaldehüüdi. Proove, mis sisaldasid max 3 µg RNAd (6,6 µl), 5,4 µl formaldehüüdi, 3 µl 10x MOPS puhvrit ja 15 µl formamiidi, denatureeriti lisaks 15 minutit 55°C juures. Seejärel pandi need kiiresti jääle, et sekundaarstruktuurid uuesti ei moodustuks, ning lisati 6 µl värvi Bromophenole Blue Agarose Dye (1:6)(0,25% bromofenoolsinine ja 40% sahharoos). Samamoodi toimiti markeritega RiboRuler High Range RNA Ladder ja RiboRuler Low Range RNA Ladder (Thermo Scientific), ent kogused olid kolmandiku võrra väiksemad. Elektroforeesi puhver oli 1x MOPS puhver. Elektroforeesi esimese tunni jooksul lasti geeli pingel 60 V ning seejärel pingel 85 V.

2.2.6.2. RNA ülekanne membraanile

Klaaskausi peale, milles oli 10x SSC lahus (vt lisa 1), asetati klaasplaat, millele pandi omakorda kaks Whatman 3M paberi riba. Need olid piisavalt laiad, et sinna mahtus täielikult peale geel, ning nii pikad, et nende otsad ulatusid 10x SSC lahusesse. Geel lõigati nii väikseks kui võimalik ning geelitükk, milles olid markerid, pandi umbes tunniks loksuma 50 ml MQ vette, kuhu oli lisatud 3 µl Sybr Gold (Invitrogen) värvi. Geeli loputati esmalt 15 minuti vältel MQ vees ning seejärel 2x 5 minutit 10x SSC lahuses. Geel asetati tagurpidi Whatmani paberi ribadele ning geeli peale pandi sama suur positiivselt laetud nailonmembraani (Roche) tükk ja kaks Whatman paberi tükki, mis olid tehtud märjaks esmalt MQ vees ning seejärel 10x SSC lahuses. Kõige peale asetati umbes 7-8 cm paksune paberrätikute kiht, klaasplaat ning mõnesajagrammine raskus. RNA ülekanne geelilt membraanile kapillaarjõudude mõjul toimus üleöö. RNA kinnitati membraanile UV kiirguse abil masinas UV Stratalinker 1800 (Stratagene)(Autocrosslink programm).

2.2.6.3. Hübridisatsioon

Membraane prehübridiseeriti 40 ml hübridisatsioonipuhvriga (vt lisa 1) ilma oligonukleotiidideta vähemalt 3 tundi 62°C juures hübridiseerimismasinas Hybrigene (Techne). Seejärel lisati oligonukleotiidid (Fluo oligonukleotiide 1 µl (100 pmol) ja Cy5 oligonukleotiide 5 µl (50 pmol)) ning hübridisatsioon toimus üleöö 62°C juures. Ühe hübridisatsiooni käigus lisati nii Fluo kui ka Cy5 oligot, mis seonduvad sama rRNA molekuli eri järjestustele, et võrrelda erinevate detektsioonimeetoditega saadavaid pilte (vt alapeatükk 2.2.7.).

2.2.6.4. Membraani pesu

Membraani pesti 3x 5 minutit roostevabas karbis pesupuhvriga (vt lisa 1) 43°C juures. Seejärel tehti detektsioon Typhooniga (loe lähemalt alapeatükist 2.2.7.). Sellele järgnes 30-sekundiline loputus 1x MAB+Tween lahusega ning membraani loksumine 1x MAB+Block lahuses 1,5 tunni jooksul (vt lisa 1). Seejärel lisati lahusele 3 µl Anti-Fluorescein-AP Fab Fragments antikeha (Roche), millele on konjugeeritud aluseline fosfataas, ning selles inkubeeriti membraani 30 minutit. Järgnes 50-100 ml loputus ja kahekordne 20-minutiline pesu umbes 250 ml 1x MAB+Tween lahusega. Enne CDP-Star kemoluminestsentse substraadiga (Sigma) töötlust hoiti membraani 3 minutit 100 ml 1x detektsioonipuhvris (vt lisa 1).

2.2.7. Signaali detekteerimine

Membraani hoiti pärast 3 minutit 1x detektsioonipuhvris umbes 15 minutit CDP-Star kemoluminestsentse substraadiga (1-1,5 ml) kile vahel. Substraadi lõikamisel aluselise fosfataasi poolt tekkinud valgust salvestati kahel moel. Esiteks ilmutati pilt filmile ning seejärel tehti digitaalne pilt kaameraga ImageQuant RT ECL (GE Healthcare).

Cy5 oligonukleotiidid, mis olid hübridiseerunud RNAle membraanil, eraldasid fluorestsentsvalgust, mida oli võimaline detekteerida Typhoon TRIO (Amersham Biosciences). Tulemuseks oli digitaalne pilt. 23S-h25-Cy5 oligonukleotiidi puhul oli PMT=450, EUB338-Cy5 puhul PMT=500.

Erinevaid detektsioonimeetodeid ja oligonukleotiide kasutati seetõttu, et saada ammendav pilt ribosoomide lagundamise kohta. Kuigi filmile ilmutamine on väga tundlik meetod – piisavalt pika ilmutamisaja jooksul on näha ka väiksemad kogused uuritavat RNAd -, kipub tugevamate vöötide signaal üle võimenduma ja seetõttu väheneb lähedaste vöötide eristatavus. Samas ei ole nõrgemaid vööte digitaalsel detektsioonil mõnikord näha. 23S rRNA tuvastamiseks kasutati paralleelselt 23S-h25-Cy5 ning 23S-190-Fluo oligonukleotiide. 16S rRNA tuvastamiseks kasutati paralleelselt EUB338-Cy5 ning 16S-1220-Fluo oligonukleotiide.

2.2.8. Membraani puhastamine oligonukleotiididest

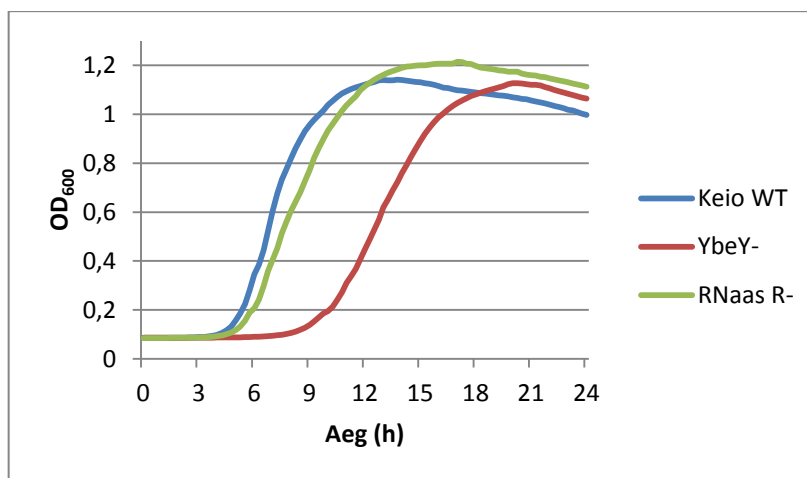
Selleks, et membraani saaks hübridiseerida järgmiste oligonukleotiididega, pidi selle eelnevatest puhastama. Puhastuslahus (vt lisa 1) kuumutati keemiseni ning membraani lokutati kuumas puhastuslahuses 10 minutit. Seda etappi korrati. MQ veega loputamise järel sai membraani taaskasutada hübridisatsioonil või seda talletada kilekaante vahele suletuna 10x SSC lahuses +4°C juures tulevaseks kasutamiseks.

2.3. Tulemused

Selleks, et uurida ribonukleaaside RNAas R ja YbeY rolli ribosoomide lagundamisel, kasutati tüvesid, millest vastavad RNAasid puuduvad, ning võrreldi tulemusi Keio metsiktüüpi tüve tulemustega.

2.3.1. Kasvukõverad 37°C juures

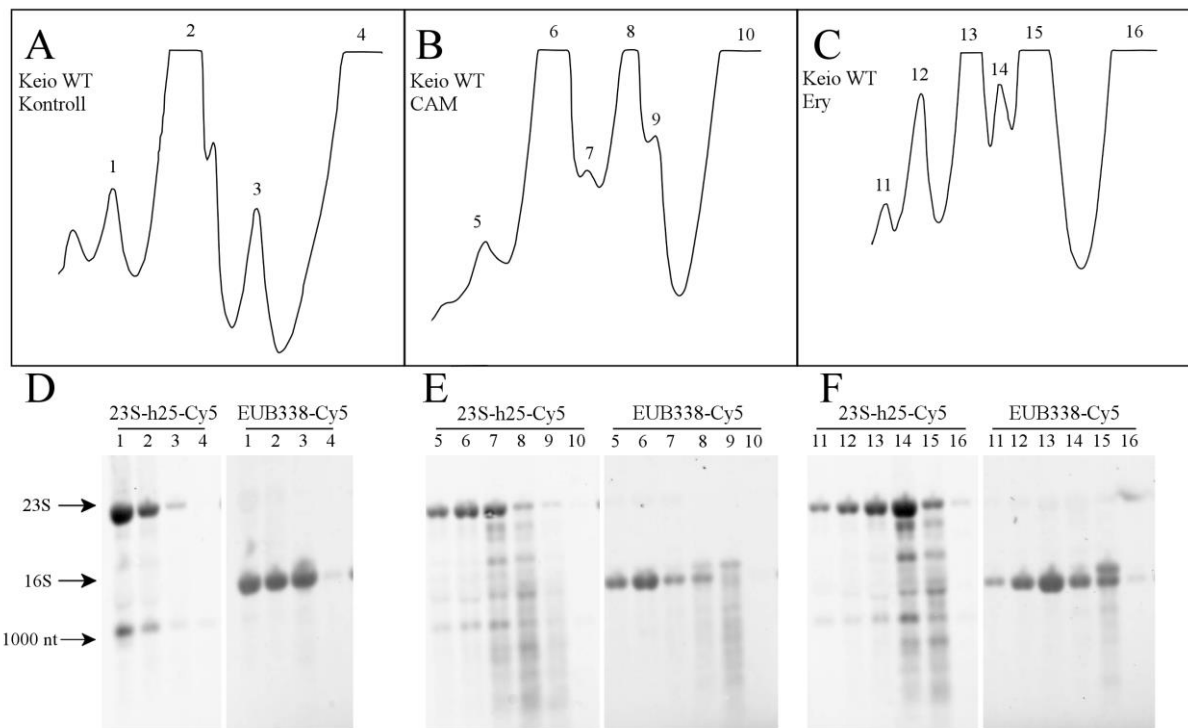
Keio metsiktüüpi tüve ning RNAas R⁻ ja YbeY⁻ tüvede kasvukõverad 37°C juures LB söötmes kasvades on ära toodud joonisel 6. Saadud andmed kattuvad kirjanduse andmetega (Davies *et al.*, 2010). On näha, et RNAas R⁻ tüvi kasvab umbes sama kiiresti kui Keio metsiktüüpi tüvi, kuid YbeY⁻ tüvi alustab kasvamist hiljem – selle tüve puhul on *lag*-faas pikem.



Joonis 6. Uuritavate tüvede (Keio WT, YbeY⁻, RNAas R⁻) kasvukõverad 37°C juures LB söötmes. Katse algab nullpunktis 4000x lahjendusest 1h 37°C juures kasvanud 3 ml kultuurist, mis on omakorda 50x lahjendus üleöö kultuurist. Keio WT ja YbeY⁻ tüvede kasvukõverad on leitud kolme, RNAas R⁻ tüve kasvukõver kahe eksperimendi keskmisena. x-teljel on aeg tundides, y-teljel optiline tihedus mõõdetuna 600 nm juures.

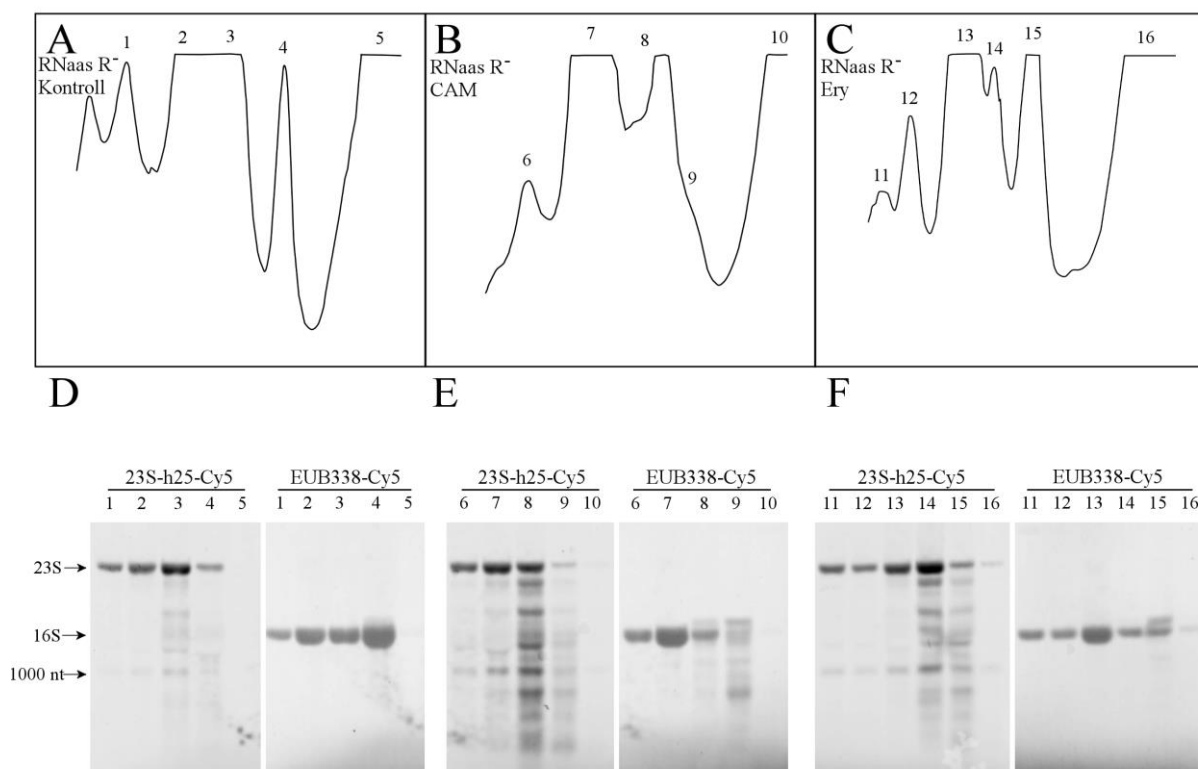
2.3.2. Ribosoomide lagundamine

Keio metsiktüüpi tüve kontrollproovis ilma antibiootikumita (vt joonis 7, paneelid A ja D) on 1. fraktsioonis disoomid, 2. fraktsioonis 70S ribosoomid ja 50S alamühikud, mida ei õnnestunud üksteisest eraldada, ning 3. fraktsioonis on 30S alamühikud. Neljas, pinnafraktsioon, sisaldab lahustunud osakesi, näiteks valke ja lühemaid oligonukleotiide. Võrreldes kontrolliga on antibiootikumide juuresolul kasvanud proovides näha enam rRNA fragmente, mis annavad tunnistust rRNA lagunemisest. Rakkudes, mis on kasvanud antibiootikumide juuresolul (joonis 7, paneelid B ja E, C ja F), on tekkinud ribosoomide lisapartiklid, mis koosnevad suurel määral rRNA laguproduktidest. Siibak ja kaasautorid (2009) on näinud kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul ribosoomide profiilides sarnaseid efekte ning on nimetanud 30S ja 50S piikide vahel sedimenteervad lisapartiklid,



Joonis 7. Keio metsiktüüpi tüve ribosoomide profiilid sahharoosigradiendis A) ilma antibiootikumita, B) kloramfenikooli olemasolul (7 µg/ml) ja C) erütromütsiini olemasolul (100 µg/ml) LB söötmes. Paneelidel D, E ja F on kujutatud vastavate proovide fraktsioonide Northern blot meetodil saadud rRNA mustrid.

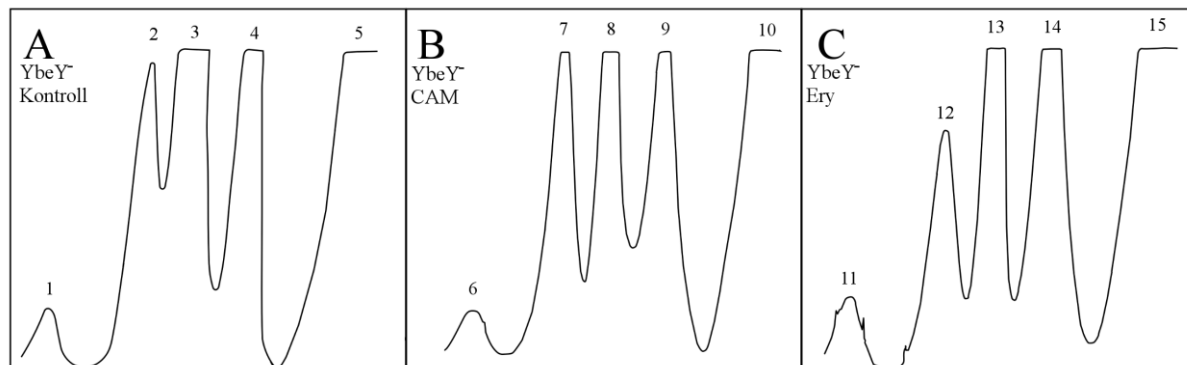
mis sisaldavad peamiselt 23S rRNA-d, 40S osakesteks ning 30S alamühikutest aeglasemalt sadenevad lisapartiklid 20S osakesteks. Need on kooskõlalised meie tulemustega (joonis 7, paneel B, fraktsioonid 7 ja 9). Kloramfenikooliga proovis (joonis 7, paneelid B ja E) on näha, et 23S rRNA laguproduktide suurus väheneb: fraktsioonis 7 on rohkem suuremaid laguprodukte, mida fraktsioonis 9 enam ei ole, kuid seevastu on fraktsioonides 8 ja 9 rohkem väiksemaid 23S laguprodukte. Lõikekohad eri fraktsioonide vahel ei näi erinevat. Fraktsioonides 8 ja 9 on näha ka 16S rRNA laguprodukte ning küpsest 16S rRNA-st kõrgemal asuvat vööti, mille näol on ilmselt tegu 16S rRNA translatsiooniliselt inaktiivse eellasmolekuliga, mida ei leidu aktiivsete ribosoomide fraktsioonides. Erütromütsiini mõju rRNA lagundamise mustrile (joonis 7, paneelid F) näib olevat üldjoontes sarnane kloramfenikooli omale, kuigi ribosoomi profiilides (paneelid B ja C) osakeste jaotus erineb, näiteks on eraldatud nii trisoomid (11) kui ka disoomid (12). Huvitaval kombel leidub nii kontrollproovis kui ka antibiootikumidega proovides veidi üle 1000 nukleotiidi pikkune lisavööt, mida leidub igas fraktsioonis, kus on 23S rRNA, ning seda ka teiste tüvede proovides. Selle 23S rRNA fragmendi olemasolu põhjus pole meile teada, kuid selle esinemise universaalsus meie katsetes (sõltumatult tüvest või antibiootikumi olemasolust) ning olemasolu translatsiooniliselt aktiivsetes fraktsioonides viitab sellele, et tõenäoliselt on tegemist rakkude või fraktsioonide töötlemise käigus tekkinud eksperimentaalse artefaktiga.



Joonis 8. RNAas R⁻ tüve ribosoomide profiilid sahharoosigradiendis A) ilma antibiootikumita, B) kloramfenikooli olemasolul (7 µg/ml) ja C) erütromütsiini olemasolul (100 µg/ml) LB söötmes. Paneelidel D, E ja F on kujutatud vastavate proovide fraktsioonide Northern blot meetodil saadud rRNA mustrid.

Ka RNAasR⁻ tüve ilma antibiootikumideta proovis on ribosome lagundatud vähem kui antibiootikumidega proovides (joonis 8). Ilma antibiootikumideta kasvanud rakkudest (joonis 8, paneelid A ja D) on õnnestunud eraldada disoomid (1), kuid taas pole olnud võimalik eristada 70S ribosome ja 50S alamühikuid (fraktsioonid 2 ja 3). Fraktsioon 4 sisaldab põhiliselt 30S alamühikuid, kuid toimunud on ka vähene 23S rRNA ülekanne 3. fraktsioonist. Pinnafraktsioonis (5) ei ole märgata rRNA väikeste laguproduktide kuhjumist. RNAasR⁻ tüve antibiootikumidega proovide ribosoomide profiilid sarnanevad Keio WT tüve vastavatele profiilidele. RNAas R⁻ tüve kloramfenikooliga (paneelid B ja E) ja erütromütsiiniga (paneelid C ja F) proovides on eristatavad laguproduktidest moodustunud lisapartiklid, mis sisaldavad põhiliselt 23S rRNA, aga vähemal määral ka 16S rRNA fragmente (fraktsioonid 8, 9, 14 ja 15). Tundlikumat meetodit kasutades tehtud piltidel on näha, et tegelikult leidub ka 15. fraktsioonis 16S laguprodukte nagu Keio WT tüve vastavas fraktsioonis (15) (vt joonis 10, lisa 2). Ka RNAas R⁻ tüves on kõikides proovides eristatav veidi üle 1000 nt suurune 23S rRNA lisafragment. Antibiootikumidega proovides on näha 16S rRNA eellast lisavöödina küpse 16S rRNA vöödi kohal sarnaselt Keio WT tüvele (paneel E, fraktsioonid 8 ja 9; paneel F, fraktsioon 15) ning ka siin ei leidu seda ootuspäraselt aktiivsete ribosoomide fraktsioonides.

Keio WT ja RNAas R⁻ tüvede kloramfenikooliga ja erütromütsiiniga töödeldud proovide pinnafraktsioonides (kuid mitte antibiootikumideta kontrolli omades) esines tegelikult ka vähesel määral väikseid rRNA laguprodukte, mis olid tuvastatavad ilmutatud filmil pärast CDP-Star tötlust (vt joonis 10, lisa 2).



Joonis 9. YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilid sahharoosigradiendis A) ilma antibiootikumita, B) kloramfenikooli olemasolul (7 µg/ml) ja C) erütromütsiini olemasolul (100 µg/ml) LB söötmes.

YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilide erinevus antibiootikumide juuresolul Keio WT ja RNAas R⁻ tüvede omadest on ilmne (joonis 9). Kuigi ilma antibiootikumideta kontrollproovis (paneel A) ei ole suudetud täielikult eraldada 70S ribosoomi (2) ja 50S alamühikuid (3), on kõik kolm pilti (paneelid A, B ja C) omavahel võrreldavad ning antibiootikumide lisamine (paneelid B ja C) ei näi olevat tekitanud ribosoomide lisaosakesi nagu Keio WT ja RNAas R⁻ tüvedes (joonised 7 ja 8). Kõigil YbeY⁻ tüve kolmel profiilil vastab esimene piik disoomidele, teine piik 70S ribosoomidele, kolmas piik 50S alamühikule, neljas piik 30S alamühikule ning viies piik kujutab pinnafraktsiooni. Võrreldes Keio WT tüve ilma antibiootikumita kontrollprooviga, on YbeY⁻ tüve kontrollproovis vähem nii polüsoome kui ka 70S ribosoomi. Seda on näinud ka Rasouly ja kaasautorid (2009). Kuigi YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilid on reprodutseeritavad, on kahe eri eksperimendi fraktsioonide uurimisel Northern bloti meetodiga saadud andmetes mõningad vastuolud ning seetõttu pole enne katse kordamist ning olukorra selgumist YbeY⁻ tüve ribosoomide lagundamise mustreid esitatud.

2.3.3. Antibiootikumide minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid

Kloramfenikooli ja erütromütsiini minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid Keio WT, RNAas R⁻ ja YbeY⁻ tüvedes määrati 30°C juures 20-tunnise kasvukõverate mõõtmise käigus (vt tabel 3). Minimaalseks inhibitoorseks kontsentratsiooniks loeti kõige väiksem antibiootikumi kontsentratsioon, mille juures bakterikultuuri tihedus ei ületanud optilist tihedust 0,1. Katse tulemusel selgus, et *rnr* ja *ybeY* geenide deletsioonid ei muuda *E. coli*'t tundlikumaks kloramfenikooli suhtes. Samas muudab *ybeY* geeni puudumine *E. coli*

tundlikumaks erütromütsiini suhtes. Need tulemused koos andmetega ribosoomide lagundamise kohta kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul ei kinnita meie hüpoteesi, mille kohaselt kloramfenikooli või erütromütsiini võime rakkude kasvu inhibeerida sõltub ribosoomide lagundamise soodustamisest nende antibiootikumide poolt.

Tabel 3. Antibiootikumide minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid uuritavates tüvedes (Keio WT, RNAas R⁻ ja YbeY⁻) 30°C juures.

Tüvi	Kloramfenikool (µg/ml)	Erütromütsiin (µg/ml)
Keio WT	2,5	40
RNAas R ⁻	2,5	40
YbeY ⁻	2,5	10

2.4. Arutelu

Antud töös on uuritud ribosoomide lagundamist tüvedes, kust puuduvad ribonukleaasid RNAas R ja YbeY. RNAas R⁻ tüves märgati mõningate rRNA laguproduktide kuhjumist ja Keio WT tüvele sarnaste ribosoomide lisapartiklite teket kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul. YbeY⁻ tüves antibiootikumide lisamine ribosoomide lisapartiklite teket esile ei kutsunud. Antibiootikumide minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid näitasid aga võrreldes Keio WT tüvega YbeY⁻ tüve suurenenud tundlikkust erütromütsiini suhtes,.

Käesolevas töös on leitud kinnitust kirjanduse andmetele (nt Davies *et al.*, 2010), mille kohaselt RNAas R⁻ tüve kasvukiirus on väga sarnane metsiktüüpi tüve omaga, kuid YbeY⁻ tüvi kasvab aeglasemalt. Mõlemad ribonukleaasid osalevad rakkudes RNA metabolismis ning neid on seostatud rRNA protsessimise, ribosoomide kvaliteedikontrolli ja lagundamisega. Võib oletada, et nende ensüümide puudumisest tingitud erinevusi kasvukiiruses võiks seletada sellega, et RNAas R-i funktsioonid kattuvad teiste eksoribonukleaaside omadega, näiteks 16S rRNA protsessimisel ja ribosoomide lagundamisel, ning seetõttu kompenseeritakse RNAas R-i puudumist (Sulthana ja Deutscher, 2013; Basturea *et al.*, 2011). Samas ei ole kirjanduses teada antud ühestki valgust peale YbeY enda, mis suudaks $\Delta ybeY$ tüves YbeY aktiivsust komplementeerida. Davies ja kaasautorid (2010) on esitanud ka $\Delta ybeY \Delta rnr$ tüve kasvukõvera, mille kasvukiirus on tähelepanuväärselt väiksem kui eelnevalt mainitud tüvedel. Kindlasti pakub tulevikus meie laborile huvi uurida ka $\Delta ybeY \Delta rnr$ tüve ribosoomide profile.

Võrreldes eri tüvede puhul antibiootikumide minimaalseid inhibitoorseid kontsentratsioone ning ribosoomide profile erütromütsiini juuresolul, võib näha ootamatut seost. Nimelt näib YbeY⁻ tüve kasv olevat erütromütsiini suhtes tundlikum kui Keio WT või RNAas R⁻ tüve kasv, ent ribosoomide profiilides see ei kajastu. YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilid antibiootikumidega proovides on sarnased ilma antibiootikumita kontrollile, samas kui Keio WT ja RNAas R⁻ tüvedes tekivad antibiootikumide lisamisel rRNA fragmente sisaldavad ribosoomide lisapartiklid. See võib tähendada, et YbeY on vajalik nende lisapartiklite tekkeks ning antibiootikumid mõjutavad YbeY⁻ tüve kasvu negatiivselt mõne muu rakulise protsessi käigus. Meie andmete põhjal on kloramfenikooli minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon kõikides uuritud tüvedes 2,5 µg/ml. See tähendab, et RNAas R-i ega YbeY puudumine ei muuda *E. colit* kloramfenikooli suhtes tundlikumaks. Sellele vastupidist on oma töös täheldanud Frazier ja Champney (2012), kes on näinud nelja erineva tüve, kust puudub mõni ribonukleaas (RNAas III, RNAas E, RNAas G ja RNAas PH), kasvu suurenenud tundlikkust aminoglükosiidsetele antibiootikumidele neomütsiin ja paromomütsiin. Selline erinevus võib tuleneda uuritud antibiootikumide toimemehhanismide erinevusest.

Antibiootikumid kloramfenikool ja erütromütsiin inhibeerivad *E. coli* translatsiooni, kuid peale selle takistavad ka korrektset ribosoomide kokkupanekut (Siibak *et al.*, 2009). Vead ribosoomide kokkupanekul viivad aga suurema hulga rRNA lagunemiseni (Frazier ja Champney, 2012). Kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul tekivad *E. coli* ribosoomide lisapartiklid, mis sisaldavad rRNA fragmente. Need lisapartiklid erinevad ribosoomide alamühikutest ka valgulise koostise poolest (Siibak *et al.*, 2011). RNAas R on eksoribonukleas, mis on võimeline lagundama sekundaarstruktuuridega RNAd ning selle osalust on näidatud rRNA lagundamisel nii ribosoomide vigase kokkupaneku vaheproduktide lagundamisel kui ka rakkude stressi ajal (Basturea *et al.*, 2011). Seega peaksid RNAas R-i puudumisel kuhjuma rakkudes fragmendid, mille lagunemisel ta tavatingimustel osaleb. Meie analüüsides näib RNAas R⁻ tüve ribosoomide fraktsioonides laguprodukte olevat rohkem kui Keio metsiktüüpi tüve omades. Väga suuri kontraste aga ei esine ning seda võib seletada teiste, RNAas R-i funktsioone dubleerivate eksoribonukleaside olemasoluga rakkudes (PNPaas, RNAas II, RNAas PH)(Basturea *et al.*, 2011).

Kui meie hüpotees, et YbeY endonukleasne aktiivsus lõikab rRNA fragmentideks enne nende lõplikku lagundamist eksoribonukleaside nagu RNAas R poolt, vastab tõele, peaksid YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilid näitama teistsugust pilti kui Keio WT ja RNAas R⁻ tüvede profiilid. Kui YbeY on ainus endoribonukleas, mis rRNA lagundamisel osaleb, siis ei tohiks YbeY⁻ tüves tekkida väiksemaid rRNA fragmente, kuid oleks loomulik, et kuhjuksid rRNA valesti protsessitud eellased. Kui YbeY on vaid üks mitmest endonukleasist, mis selliseid lõikeid teeb, võiks selle puudumisel leiduda ka rRNA laguprodukte. Meie YbeY⁻ tüve ribosoomide profiilid viitavad esimesele stsenaariumile, sest antibiootikumide juuresolul ei leidu rRNA laguproduktidest ribosoomide lisapartikleid, mida leidub Keio WT ja RNAas R⁻ tüvede proovides. Näib, et YbeY võib olla oluline selliste lisapartiklite tekkimisel. Samas on YbeY⁻ tüve ribosoomide sahharoosigradiendi fraktsioonide analüüs Northern blotil andnud meile vastuolulisi andmeid (andmeid ei ole esitatud), mis ei välista ka teist võimalust. Kindlasti peab enne lõplike järelduste tegemist eksperimenti YbeY⁻ tüvega kordama.

Edasised uurimissuunad meie töörühmas kätkevad endas kindlasti YbeY rolli uurimist ribosoomide lagundamisel. Huvitav oleks uurida, kas $\Delta nr\Delta ybeY$ tüve aeglane kasv kajastub kuidagi ka ribosoomide profiilides ning kas selle põhjus võib peituda vigases ribosoomide lagundamises. Peale selle tasuks lähemalt uurida ka RNAas LS⁻ tüve ribosoomide profile, sest kirjanduses (Otsuka ja Yonesaki, 2005) on seda endoribonukleasi seostatud 23S rRNA metabolismiga.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti ribosoomide lagundamist ribonukleaside RNAas R ja YbeY puudumisel *E. colis*. Peale selle vaadeldi antibiootikumide kloramfenikooli ja erütromütsiini, mis inhibeerivad valgusünteesi ja mille tõttu tekivad vead ribosoomide kokkupanekul, mõju nende protsessidele. Keio WT, RNAas R⁻ ja YbeY⁻ tüvede antibiootikumideta kasvanud kultuuride ribosoomide profiilid olid küllaltki sarnased, kuigi YbeY⁻ tüves leidis vähem aktiivselt transleerivaid ribosoomi. Kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul kasvanud Keio WT ja RNAas R⁻ tüvede ribosoomide profiilid näitasid aga ribosoomide lisapartiklite teket. Northern blot meetodil saadud rRNA mustritest oli näha, et lisapartiklitesse kuuluvad peale küpsete 23S ja 16S rRNA molekulide ka nende fragmendid. Need andmed viitavad ribosoomide intensiivsemale lagundamisele kloramfenikooli ja erütromütsiini juuresolul nendes tüvedes. YbeY⁻ tüve ribosoomide profiile antibiootikumide lisamine ei mõjutanud, mis annab alust arvata, et endonukleas YbeY mängib rolli ribosoomide lisapartiklite tekkes. Ometi ei saa lugeda tõestatuks meie hüpoteesi, et YbeY on endoribonukleas, mis on vajalik rRNA fragmentide tekkeks ribosoomide lagundamise protsessis, sest Northern bloti meetodil saadud rRNA mustrites kahest eri eksperimendist leidis vastuolusid. Seega on vaja teha sellele küsimusele vastuse välja selgitamiseks täiendavaid katseid. Peale selle avastati, et uuritavate tüvede kasvu tundlikkuse suurenemisel kloramfenikooli ja erütromütsiini suhtes ei ole positiivset seost ribosoomide lagundamise elavnemisega. Seetõttu ei ole alust väita, et ribosoomide lagundamise soodustamine on osa kloramfenikooli ja erütromütsiini toimemehhanismist *E. coli* kasvu inhibeerimisel.

On the Roles of Ribonucleases RNase R and YbeY in Ribosome Degradation in *Escherichia coli*

Sille Hausenberg

SUMMARY

Ribosomes are important organelles in the cells because they conduct protein synthesis. Proteins are necessary building blocks of the organism and they are needed for growth and reproduction. Ribosomes are made of ribosomal RNA (rRNA) and ribosomal proteins and their amount has to increase before the division of the cell. Therefore a lot of resources and energy are used to produce ribosomes. However, it has been discovered that in a number of conditions ribosomes are degraded (review in Deutscher, 2009; Maiväli *et al.*, 2013). The causes for ribosome degradation have been studied in a model organism, *Escherichia coli* but the exact mechanisms remain unknown. A rise in rRNA fragments has been observed in the absence of certain exoribonucleases and therefore these enzymes have been held responsible for degradation of these fragments (Basturea *et al.*, 2011). However, the identity of endoribonucleases which are responsible for the first cuts in rRNA has remained a mystery (Deutscher, 2009).

In this work, we have conducted research on the roles of two ribonucleases, RNase R and YbeY in ribosome degradation. RNase R is an exoribonuclease which has been shown to participate in the ribosome degradation caused both by both defects in ribosome assembly and starvation (Basturea *et al.*, 2011). It is distinct from other exoribonucleases in *E. coli* due to its ability to degrade RNA with secondary structures (Cheng and Deutscher, 2002). YbeY is an endoribonuclease which has been shown to participate in a quality control mechanism of 70S ribosome in cooperation with RNase R (Jacob *et al.*, 2013). Furthermore, there is a hypothesis that YbeY might be the endonuclease that initiates ribosome degradation. We have tested this hypothesis by comparing the ribosome profiles and patterns from Keio wild type, RNase R⁻ and YbeY⁻ strains and studying the effects of protein synthesis inhibiting antibiotics chloramphenicol and erythromycin on them.

We have discovered that the presence of chloramphenicol and erythromycin enhances ribosome degradation in RNase R⁻ strain as has been already shown to be the case in Keio wildtype strain (Siibak *et al.*, 2009). There are additional ribosomal particles that do not

correspond to 70S ribosomes and 30S or 50S subunits in the ribosome profiles of these two strains in the presence of antibiotics. These particles contain degradation products of 23S and 16S rRNAs as seen from the rRNA patterns obtained by hybridization with rRNA specific oligonucleotides and Northern blotting. However, the antibiotics do not seem to have any effect on ribosome degradation in YbeY⁻ strain according to the ribosome profiles. The antibiotic-treated samples are similar to the control without antibiotic and the generation of additional ribosomal particles is not detected. This seems to indicate that YbeY is involved in the induction of these particles and therefore might be the endonuclease that initiates ribosome degradation. Nevertheless, this is not our final conclusion since we have observed some contradictions in the data of rRNA patterns from different experiments. Thus, it is necessary to conduct more experiments in order to clear this subject. In addition to the previous experiments, we also measured the minimal inhibitory concentrations of chloramphenicol and erythromycin in Keio wildtype, RNase R⁻ and YbeY⁻ strains. We discovered that removal of RNase R and YbeY does not make cell growth more sensitive to chloramphenicol, but removal of YbeY does increase the sensitivity to erythromycin. We have concluded that the promotion of ribosome degradation does not seem to be a part of the cell growth inhibiting mechanism of these antibiotics since the increase in sensitivity does not correspond to the enhancement of ribosome degradation.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Alluri, R. K., Li, Z. (2012). Novel One-step Mechanism for tRNA 3'-End Maturation by the Exoribonuclease RNase R of *Mycoplasma genitalium*. J Biol Chem. 287: 23427-23433.
- Andrade, J. M., Cairrão, F., Arraiano, C. M. (2006). RNase R affects gene expression in stationary phase: regulation of ompA. Mol Microbiol. 60: 219-228.
- Andrade, J. M., Hajnsdorf, E., Régnier, P., Arraiano, C. M. (2009). The poly(A)-dependent degradation pathway of rpsO mRNA is primarily mediated by RNase R. RNA. 15: 316-326.
- Awano, N., Xu, C., Ke, H., Inoue, K., Inouye, M., Phadtare, S. (2007). Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherichia coli* csdA deletion strain. J Bacteriol. 189: 5808–5815.
- Awano, N., Rajagopal, V., Arbing, M., Patel, S., Hunt, J., Inouye, M., Phadtare, S. (2010). *Escherichia coli* RNase R Has Dual Activities, Helicase and RNase. J Bacteriol. 192: 1344-1352.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants – the Keio collection. Mol Systems Biol. 2: 2006.0008.
- Barbas, A., Matos, R. G., Amblar, M., López-Viñas, E., Gomez-Puertas, P., Arraiano, C. M. (2008). New Insights into the Mechanism of RNA Degradation by Ribonuclease II. J Biol Chem. 283: 13070-13076.
- Basturea, G. N., Zundel, M. A., Deutscher, M. P. (2011). Degradation of ribosomal RNA during starvation: Comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. RNA. 17: 338-345.
- Basturea, G. N., Harris, T. K., Deutscher, M. P. (2012). Growth of a bacterium that apparently uses arsenic instead of phosphorus is a consequence of massive ribosome breakdown. J Biol Chem. 287: 28816-28819.
- Bessarab, D. A., Kaberdin, V. R., Wei, C.-L., Liou, G.-G., Lin-Chao, S. (1998). RNA components of *Escherichia coli* degradosome: Evidence for rRNA decay. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 3157-3161.

- Bollenbach, T. J., Lange, H., Gutierrez, R., Erhardt, M., Stern, D. B., Gagliardi, D. (2005). RNR1, a 3'–5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*. 33: 2751-2763.
- Bram, R. J., Young, R. A., Steitz, J. A. (1980). The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. Cell. 19: 393-401.
- Bycroft, M., Hubbard, T. J. P., Proctor, M., Freund, S. M. V., Murzin, A. G. (1997). The Solution Structure of the S1 RNA Binding Domain: A Member of an Ancient Nucleic Acid–Binding Fold. Cell. 88: 235-242.
- Cairrão, F., Arraiano, C. M. (2006). The role of endoribonucleases in the regulation of RNase R. Biochem Biophys Res Commun. 343: 731-737.
- Cairrão, F., Cruz, A., Mori, H., Arraiano, C. M. (2003). Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. 50: 1349-1360.
- Campos-Gillén, J., Arvizu-Gómez, J. L., Jones, G. H., Olmedo-Alvarez, G. (2010). Characterization of tRNACys processing in a conditional *Bacillus subtilis* CCase mutant reveals the participation of RNase R in its quality control. Microbiology. 156: 2102-2111.
- Cech, T. R. (2000). The Ribosome is a Ribozyme. Science. 289: 878-879
- Charpentier, X., Faucher, S. P., Kalachikov, S., Shuman, H. A. (2008). Loss of RNase R Induces Competence Development in *Legionella pneumophila*. J Bacteriol. 190: 8126-8136.
- Chen, C., Deutscher, M. P. (2005). Elevation of RNase R in Response to Multiple Stress Conditions. J Biol Chem. 280: 34393-34396.
- Chen, C., Deutscher, M. P. (2010). RNase R is a highly unstable protein regulated by growth phase and stress. RNA. 16: 667-672.
- Cheng, Z.-F., Zuo, Y., Li, Z., Rudd, K. E., Deutscher, M. P. (1998). The vacB Gene Required for Virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* Encodes the Exoribonuclease RNase R. J Biol Chem. 273: 14077-14080.
- Cheng, Z.-F., Deutscher, M. P. (2002). Purification and Characterization of the *Escherichia coli* Exoribonuclease RNase R. J Biol Chem. 277: 21624-21629.
- Cheng, Z.-F., Deutscher, M. P. (2003). Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. PNAS. 100: 6388-6393.

- Cheng, Z.-F., Deutscher, M. P. (2005). An Important Role for RNase R in mRNA Decay. *Mol Cell*. 17: 313-318.
- Chittum, H. S., Champney, W. S. (1995). Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr Microbiol*. 30: 273-279.
- Davies, B. W., Köhrer, C., Jacob, A. I., Simmons, L. A., Zhu, J., Aleman, L. M., RajBhandary, U. L., Walker, G. C. (2010). Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol Microbiol*. 78: 506-518.
- Deutscher, M. (2009). Maturation and Degradation of Ribosomal RNA in Bacteria. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 85: 369-390.
- Domingues, S., Mator, R. G., Reis, F. P., Fialho, A. M., Barbas, A., Arraiano, C. M. (2009). Biochemical Characterization of the RNase II Family of Exoribonucleases from the Human Pathogens *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry*. 48: 11848-11857.
- Erova, T. E., Kosykh, V. G., Fadl, A. A., Sha, J., Horneman, A. J., Chopra, A. K. (2008). Cold Shock Exoribonuclease R (VacB) Is Involved in *Aeromonas hydrophila* Pathogenesis. *J Bacteriol*. 190: 3467-3474.
- Fonseca, P., Moreno, R., Rojo, F. (2008). Genomic Analysis of the Role of RNase R in the Turnover of *Pseudomonas putida* mRNAs. *J Bacteriol*. 190: 6258-6263.
- Frazier, A. D., Champney, W. S. (2012). Impairment of ribosomal subunit synthesis in aminoglycoside-treated ribonuclease mutants. *Arch Microbiol*. 194: 1033-1041.
- Foster, C., Champney, W. S. (2008). Characterization of a 30S ribosomal subunit assembly intermediate found in *Escherichia coli* cells growing with neomycin or paromomycin. *Arch Microbiol*. 189: 441-449.
- Gausing, K. (1977). Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J Mol Biol*. 115: 335-354.
- Ge, Z., Mehta, P., Richards, J., Karzai, A. W. (2010). Nonstop mRNA Decay Initiates at the Ribosome. *Mol Microbiol*. 78: 1159-1170.

- Gegenheimer, P., Apirion, D. (1975). *Escherichia coli* ribosomal ribonucleic acids are not cut from an intact precursor molecule. *J Biol Chem.* 250: 2407-2409.
- Germain, A., Kim, S. H., Gutierrez, R., Stern, D. B. (2012). Ribonuclease II preserves chloroplast RNA homeostasis by increasing mRNA decay rates, and cooperates with polynucleotide phosphorylase in 3' end maturation. *Plant J.* 72: 960-971.
- Gil, R., Silva, F. J., Peretó, J., Moya, A. (2004). Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68: 518–537.
- Grinwald, M., Ron, E. Z. (2013). The *Escherichia coli* Translation-Associated Heat Shock Protein YbeY Is Involved in rRNA Transcription Antitermination. *PloS ONE.* 8: e62297.
- Gutgsell, N. S., Jain, C. (2012). Role of precursor sequences in the ordered maturation of *E. coli* 23S ribosomal RNA. *RNA.* 18: 345-353.
- Hong, S.-J., Tran, Q.-A., Keiler, K. C. (2005). Cell-cycle regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol Microbiol.* 57: 565-575.
- Jacob, A. I., Köhrer, C., Davies, B.W., RajBhandary, U. L., Walker G. C. (2013). Conserved Bacterial RNase YbeY Plays Key Roles in 70S Ribosome Quality Control and 16S rRNA Maturation. *Mol Cell.* 49: 427-438.
- Jin, D., Cagliero, C. and Zhou, Y. (2012). Growth rate regulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 269-287.
- Kaczanowska, M. and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 477-494.
- Karzai, A. W., Sauer, R. T. (2001). Protein factors associated with the SsrA-SmpB tagging and ribosome rescue complex. *PNAS.* 98: 3040-3044.
- Kasari, V., Kurg, K., Margus, T., Tenson, T., Kaldalu, N. (2010). The *Escherichia coli* mqsR and ygiT genes encode a new toxin-antitoxin pair. *J Bacteriol.* 192: 2908-2919.
- King, T. C., Sirdeskmukh, R., Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic Processing of Ribonucleic Acid Transcripts in Procaryotes. *Microbiol Rev.* 50: 428-451.
- Lalonde, M. S., Zuo, Y., Zhang, J., Gong, X., Wu, S., Malhotra, A., Li, Z. (2007). Exoribonuclease R in *Mycoplasma genitalium* can carry out both RNA processing and degradative functions and is sensitive to RNA ribose methylation. *RNA.* 13: 1957-1968.

- LaRiviere, F. J., Cole, S. E., Ferullo, D. J., Moore, M. J. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell*. 24: 619-626.
- Li, Z., Deutscher, M. P. (1995). The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 6883-6886.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher M. P. (1999a). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J*. 18: 2878-2885.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher M. P. (1999b). Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA*. 5: 139-146.
- Liang, W., Deutscher, M. P. (2010). A Novel Mechanism for Ribonuclease Regulation: Transfer-Messenger RNA (tmRNA) and Its Associated Protein SmpB Regulate the Stability of RNase R. *J Biol Chem*. 285: 29054-29058.
- Liang, W., Deutscher, M. P. (2012a). Post-translational modification of RNase R is regulated by stress-dependent reduction in the acetylating enzyme Pka (YfiQ). *RNA*. 18: 47-41.
- Liang, W., Deutscher, M. P. (2012b). Transfer-messenger RNA-SmpB Protein Regulates Ribonuclease R Turnover by Promoting Binding of HslUV and Lon Proteases. *J Biol Chem*. 287: 33472-33479.
- Liang, W., Deutscher, M. P. (2013). Ribosomes Regulate the stability and Action of the Exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem*. 288: 34791-34798.
- Liang, W., Malhotra, A., Deutscher, M. P. (2011). Acetylation Regulates the Stability of a Bacterial Protein: Growth Stage-dependent Modification of RNase R. *Mol Cell*. 44: 160-166.
- Maes, A., Gracia, C., Hajnsdorf, E., Régnier, P. (2011). Search for poly(A) polymerase targets in *E. coli* reveals its implication in surveillance of Glu tRNA processing and degradation of stable RNAs. *Mol Microbiol*. 83: 436-451.
- Maiväli, Ü., Paier, A., Tenson, T. (2013). When stable RNA becomes unstable: the degradation of ribosomes in bacteria and beyond. *Biol Chem*. 394: 845-855.
- Malecki, M., Bárria, C., Arraiano, C. M. (2014). Characterization of the RNase R association with ribosomes. *BMC Microbiol*. 14: 34.

- Matos, R. G., Barbas, A., Arraiano, C. M. (2009). RNase R mutants elucidate the catalysis of structured RNA: RNA-binding domains select the RNAs targeted for degradation. *Biochem J.* 423: 291-301.
- Matos, R. G., Barbas, A., Gómez-Puertas, P., Arraiano, C. M. (2011). Swapping the domains of exoribonucleases RNase II and RNase R: Conferring upon RNase II the ability to degrade ds RNA. *Proteins.* 79: 1853-1867.
- Matos, R. G., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Arraiano, C. M. (2012). The only exoribonuclease present in *Haloferax volcanii* has an unique response to temperature changes. *Biochim Biophys Acta.* 1820: 1543-1552.
- Misra, T. K., Apirion, D. (1979). RNase E, an RNA Processing Enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 254: 11154-11159.
- Miyoshi, A., Rosinha, G. M. S., Camargo, I. L. B. C., Trant, C. M. C., Cardoso, F. C., Azevedo, V., Oliveira, S. C. (2007). The role of the vacB gene in the pathogenesis of *Brucella abortus*. *Microb Infect.* 9: 375-381.
- Moreira, R. N., Domingues, S., Viegas, S. C., Amblar, M., Arraiano, C. M. (2012). Synergies between RNA degradation and trans-translation in *Streptococcus pneumoniae*: cross regulation and co-transcription of RNase R and SmpB. *BMC Microbiol.* 12: 268.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* 20: 1776-1789.
- Oganesyan, V., Busso, D., Brandsen, J., Chen, S., Jancarik, J., Kim, R., Kim, S.-H. (2003). Structure of the hypothetical protein AQ_1354 from *Aquifex aeolicus*. *Acta Crystallogr D.* 59: 1219-1223.
- Otsuka, Y., Yonesaki, T. (2005). A novel endoribonuclease, RNase LS, in *Escherichia coli*. *Genetics.* 169: 13-20.
- Oussenko, I. A., Abe, T., Ujiie, H., Muto, A., Bechhofer, D. A. (2005). Participation of 3'-to-5' Exoribonucleases in the Turnover of *Bacillus subtilis* mRNA. *J Bacteriol.* 187: 2758-2767.
- Pandey, S. P., Minesinger, B. K., Kumar, J., Walker, G. C. (2011). A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic Acids Res.* 39: 4691-4708.

- Pandey, S. P., Winkler, J. A., Li, H., Camacho, D. M., Collins, J. J., Walker, G. C. (2014). Central role for RNase YbeY in Hfq-dependent and Hfq-independent small-RNA regulation in bacteria. *BMC Genomics*. 15: 121.
- Phadtare, S. (2012). *Escherichia coli* cold-shock gene profiles in response to overexpression/deletion of CsdA, RNase R and PNPase and relevance to low-temperature RNA metabolism. *Genes Cells*. 17: 850-874.
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T., Maiväli, Ü. (2011). Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Rep*. 12: 458-462.
- Purushart, R. I., Klein, F., Sulthana, S., Jäger, S., Jagannadham, M. V., Evguenieva-Hackenberg, E., Ray, M. K., Klug, G. (2005). Exoribonuclease R Interacts with Endoribonuclease E and an RNA Helicase in the Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem*. 280: 14572-14578.
- Purushart, R. I., Madhuri, B., Ray, M. K. (2007). Exoribonuclease R in *Pseudomonas syringae* Is Essential for Growth at Low Temperature and Plays a Novel Role in the 3' End Processing of 16 and 5 S Ribosomal RNA. *J Biol Chem*. 282:16267-16277.
- Rasouly, A., Schonbrun, M., Shenhar, Y., Ron, E. Z. (2009). YbeY, a Heat Shock Protein Involved in Translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 191: 2649-2655.
- Rasouly, A., Davidovich, C., Ron, E. Z. (2010) The Heat Shock Protein YbeY Is Required for Optimal Activity of the 30S Ribosomal Subunit. *J Bacteriol*. 192: 4592-4596.
- Richards, J., Mehta, P., Karzai, A. W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol Microbiol*. 62: 1700-1712.
- Russell, J. H., Keiler, K. C. (2009). Subcellular localization of a bacterial regulatory RNA. *PNAS*. 106: 16405-16409.
- Santangelo, T. J., Artsimovitch, I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nat Rev Microbiol*. 9: 319-329.
- Scott, M., Gunderson, C. W., Mateescu, E. M., Zhang, Z., Hwa, T. (2010). Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science*. 330: 1099-1102.
- Shin, J.-H., Price, C. W. (2007). The SsrA-SmpB Ribosome Rescue System Is Important for Growth of *Bacillus subtilis* at Low and High Temperatures. *J Bacteriol*. 189: 3729-3737.

- Silvers, J. A., Champney, W. S. (2005). Accumulation and turnover of 23S ribosomal RNA in azithromycin-inhibited ribonuclease mutant strains of *Escherichia coli*. Arch Microbiol. 184: 66-77.
- Siibak, T., Peil, L., Xiong, L., Mankin, A., Remme, J., Tenson, T. (2009). Erythromycin- and Chloramphenicol-Induced Ribosomal Assembly Defects Are Secondary Effects of Protein Synthesis Inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 53: 563-571.
- Siibak, T., Peil, L., Dönhöfer, A., Tats, A., Remm, M., Wilson, D. N., Tenson, T., Remme, J. (2011). Antibiotic-induced ribosomal assembly defects result from changes in the synthesis of ribosomal proteins. Mol Microbiol. 80: 54-67.
- Strader, M. B., Hervey IV, W. J., Costantino, N., Fujigaki, S., Chen, C. Y., Akal-Strader, A., Ihunnah, C., A., Makusky, A. J., Court, D. L., Markey, S. P., Kowalak, J. A. (2013). A coordinated proteomic approach for identifying proteins that interact with the *E. coli* ribosomal protein S12. J Proteome Res. 12: 1289–1299.
- Sulthana, S., Deutscher, M. P. (2013). Multiple Exoribonucleases Catalyze Maturation of the 3' Terminus of 16S Ribosomal RNA (rRNA). J Biol Chem. 288: 12574-12579.
- Sulthana, S., Rajyaguru, P. I., Mittal, P., Ray, M. K. (2011). rnr Gene from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W, Encoding a Psychrophilic RNase R. Appl Environ Microbiol. 77: 7896-7904.
- Sykes, J., Metcalf, E., Pickering, J. D. (1977). The nature of the proteins in 'chloramphenicol particles' from *Escherichia coli* A19 (Hfr rel met rns). J Gen Microbiol. 98: 1-16.
- Zhan, C., Fedorov, E. V., Shi, W., Ramagopal, U. A., Thirumuruhan, R., Manjasetty, B. A., Almo, S. C., Fiser, A., Chance, M. R., Fedorov A. A. (2005). The ybeY protein from *Escherichia coli* is a metalloprotein. Acta Crystallogr F. 61: 959-963.
- Zuo, Y., Deutscher, M. P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. Nucleic Acids Res. 29: 1017–1026.
- Tobe, T., Sasakawa, C., Okada, N., Honma, Y., Yoshikawa, M. (1992). vacB, a Novel Chromosomal Gene Required for Expression of Virulence Genes on the Large Plasmid of *Shigella flexneri*. J Bacteriol. 174: 6359-6367.

- Treyhurn, P., Duncan, J. S., Nestor, A., Thomas, M. E. A., Rayner, D. V. (1994). Chemiluminescent Detection of mRNAs on Northern Blots with Digoxigenin end-Labeled Oligonucleotides. *Anal chem.* 222: 224-230.
- Tsai, Y.-C., Du, D., Domínguez-Malfavón, L., Dimastrogiovanni, D., Cross, J., Callaghan, A. J., García-Mena, J., Luisi, B. F. (2012). Recognition of the 70S ribosome and polysome by the RNA degradosome in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 40: 10417-10431.
- Tsao, M.-Y., Lin, T.-L., Hsieh, P.-F., Wang, J.-T. (2009). The 3'-to-5' Exoribonuclease (Encoded by HP1248) of *Helicobacter pylori* Regulates Motility and Apoptosis-Inducing Genes. *J Bacteriol.* 191: 2691-2702.
- Usary, J., Champney, W. S. (2001). Erythromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol.* 40: 951-962.
- Vincent, H. A., Deutscher, M. P. (2006). Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem.* 281: 29769–29775.
- Vincent, H. A., Deutscher, M. P. (2009a). The Roles of Individual Domains of RNase R in Substrate Binding and Exoribonuclease Activity. *J Biol Chem.* 284: 486-494.
- Vincent, H. A., Deutscher, M. P. (2009b). Insights Into How RNase R Degrades Structured RNA: Analysis of the Nuclease Domain. *J Mol Biol.* 387: 570-583.
- Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. (2010). The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Science.* 330: 835-838.
- Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada A., Nagai, K. (1999). *Escherichia coli* cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 259: 483-488.
- Warner, J. R. (2013). YbeY - The Jealous Tailor. *Mol Cell.* 49: 422-423.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*, p. 423-430, 5th ed., CSHL Press, New York
- Wikström, P. M., Byström, A. S. and Björk, G. R. (1988). Non-autogenous control of ribosomal protein synthesis from the trmD operon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 203: 141–152.

Wireman, J. W., Sypherd, P. S. (1974). Properties of 30S Ribosomal Particles Reconstituted from Precursor 16S Ribonucleic Acid. *Biochemistry*. 13: 1215-1221.

Yeh, D. C., Parsons, L. M., Parsons, J. F., Liu, F., Eisenstein, E., Orban, J. (2005). NMR structure of HI0004, a putative essential gene product from *Haemophilus influenzae*, and comparison with the X-ray structure of an *Aquifex aeolicus* homolog. *Prot Sci*. 14: 424-430.

Young, R. A., Steitz, J. A. (1978). Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 3593-3597.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Pfam andmebaas, YbeY: <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF02130#tabview=tab0> (10.04.14)

Swiss-Prot andmebaas, YbeY: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A898> (30.03.14)

Swiss-Prot andmebaas, RNAas R: <http://www.uniprot.org/uniprot/P21499> (12.04.14)

Swiss-Prot andmebaas, CsdA: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A9P6> (2.05.14)

LISA 1

LP puhver

60 mM KCl
60 mM NH₄Cl
50 mM Tris puhver pH=7,9
6 mM MgCl₂
5 mM β-merkaptotetanooli (lisada 1x LP puhvrile vahetult enne kasutamist)

10x LLP puhver

250 mM Tris puhver pH=7,9
1M KCl
100 mM MgCl₂
Hoida +4°C juures.
5 mM β-merkaptotetanool (lisada 1x LLP lahusele vahetult enne kasutamist)

10x MOPS puhver

200 mM MOPS
Panna paika pH=7,0 2N NaOH abil.
50 mM naatriumatsetaat
20 mM EDTA
Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri.
Säilitada toatemperatuuril ja kaitsta valguse eest.

20x SSC lahus

3 M NaCl
0,3 mM naatriumtsitraat
Panna paika pH=7,0 HCl abil. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Autoklaavida. Säilitada toatemperatuuril.

10x Detektsioonipuhver

0,5 M TRIS alus
1 M NaCl
Panna paika pH=9,5, kasutades selleks kontsentreeritud HCl. Autoklaavida ja säilitada +4°C juures.

Hübridisatsioonipuhver

0,5 M naatriumfosfaatpuhver pH=7,2
7% SDS

Pesupuhver

20 mM naatriumfosfaatpuhver pH=7,2
1% SDS

10x MAB puhver

1 M maleiinhape
1,5 M NaCl
Panna NaOH kasutades paika pH=7,5. Filtreerida läbi 0,2 µm pooriga filtri. Autoklaavida. Säilitada +4°C juures.

1xMAB+Tween lahus

755 ml 1x MAB lahusele lisada 2,26 ml Tween20. Hoolikalt segada.

10x Block lahus

10% blokeerimisreagenti (Roche (Cat. No. 11 096 176 001)) lahustada 1x MAB puhvril. Soojendada +65°C, segada magnet-segajal. Autoklaavida, et täielikult lahustuks. Hoida 10 ml kaupa -20°C juures.

1x MAB+Block lahus

Vahetult enne kasutamist lisada 45 ml 1x MAB lahusele 5 ml sulanud Block lahust. Segada.

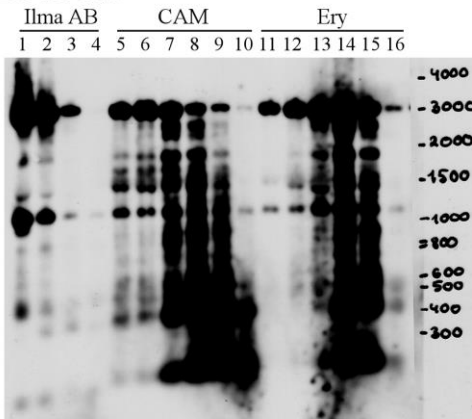
Puhastuslahus

1% SDS
5 mM EDTA (pH=8)

LISA 2

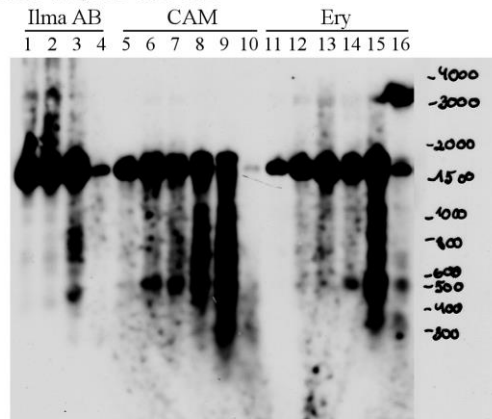
A

Keio WT, 23S-190-Fluo



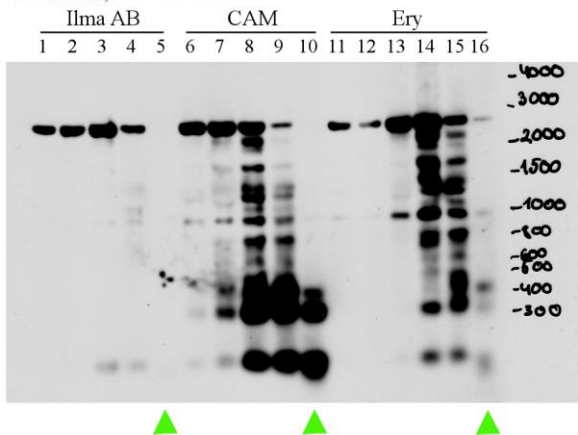
B

Keio WT, 16S-1220-fluo



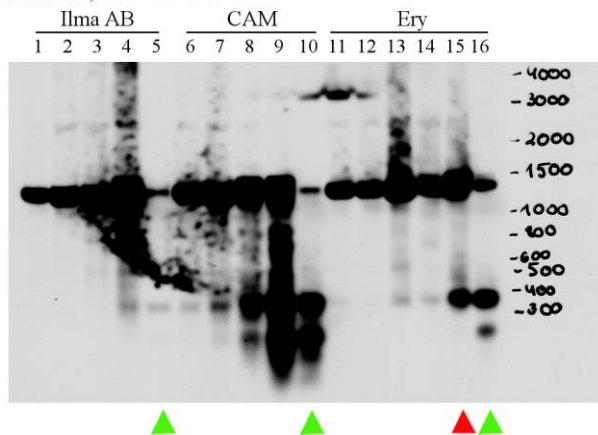
C

RNAas R⁻, 23S-190-Fluo



D

RNAas R⁻, 16S-1220-Fluo



Joonis 10. Northern blotil saadud rRNA mustrid kontrollproovidest ning kloramfenikooli ja erütromütsiiniga töödeldud proovidest. A) Keio WT tüve 23S rRNA fragmendid (23S-190-Fluo oligonukleotiid). B) Keio WT tüve 16S rRNA fragmendid (16S-1220-Fluo oligonukleotiid). C) RNAas R⁻ tüve 23S rRNA fragmendid (23S-190-Fluo oligonukleotiid). D) RNAas R⁻ tüve 16S rRNA fragmendid (16S-1220-Fluo oligonukleotiid). Roheliste nooltega on märgitud pinnafraktsioonid. Punaste nooltega on märgitud põhilised 16S rRNA laguprodukte sisaldavad fraktsioonid erütromütsiini sisaldavates proovides. Fraktsioonide numbrid vastavad joonistel 7 ja 8 kasutatud fraktsioonide tähistusele.

LIHTLITSENTS

Mina, Sille Hausenberg (sünnikuupäev: 10.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Ribonukleaaside RNAas R ja YbeY rollist ribosoomide lagundamisel *Escherichia coli*’s“,

mille juhendaja on Ülo Maiväli,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace’i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.05.2014